

Toxicidad del aluminio sobre el hueso: efecto sobre marcadores óseos en ratas en crecimiento

Mahieu, Stella; Calvo, María Luisa; Millen, Néstor; Contini, María del Carmen; Gonzalez, Marcela

Cátedra Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo, (3000). Santa Fe. Argentina. Fax 42 -571153

RESUMEN: Se estudiaron los efectos del aluminio (Al) sobre el turnover óseo y el crecimiento, en ratas intoxicadas crónicamente con hidróxido de aluminio (80 mg/Kg peso, i.p., 3 veces por semana), desde el destete, y hasta las 28 semanas de edad. El Al provocó una significativa disminución en la ganancia de peso, sin modificar la velocidad de crecimiento. La disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina en los grupos tratados, evidenció una reducción de la formación ósea en el período de crecimiento rápido. No se observaron cambios en la actividad osteoclastica reflejada por la actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente. Se observó un incremento en la excreción de hidroxiprolina al concluir el período de intoxicación. La excreción urinaria de calcio, aumentó a partir del segundo mes de tratamiento y fue acompañada de una reducción en la excreción de fosfatos, sin que existieran cambios en la concentración sérica de los mismos. Los resultados sugieren que el hueso sería más susceptible a la intoxicación con aluminio durante el período de crecimiento.

SUMMARY: The effects of aluminum (Al) on both bone turnover and growth were studied using rats chronically poisoned with aluminum hydroxide (80 mg/kg b.w., i.p., three times a week) since weaning and during 25 weeks. A significant decrease in body weight gain was noted, with no change in growth rate. A decrease in the activity of alkaline phosphatase in the groups treated revealed a decrease in bone formation during the fast growth period. No changes in the osteoclastic activity were observed, as shown by the activity of the tartrate resistant acid phosphatase. After the intoxication period finished, there was an increase in hydroxiprolin excretion. Urinary excretion of calcium was shown to increase from second month of intoxication onwards along with a decrease in phosphate excretion, but no change was found as regards their serum concentrations. The results suggest bone is more susceptible to aluminum intoxication during the growth period.

Introducción

La osteomalacia asociada al Al no solo ha sido demostrada en adultos, sino también en niños de distinta edad con falla renal, con y sin tratamiento de diálisis (1, 2, 3). En niños con función renal normal, se ha comprobado aumento de Al en plasma cuando son alimentados con fórmulas de hidrolizados de caseína (4), o en recién nacidos que reciben alimentación por vía parenteral (5). Otra fuente de exposición la constituyen las inmunizaciones que utilizan Al como adyuvante, y los suplementos de vitaminas y minerales (6).

En trabajos realizados con diversos modelos animales, se ha demostrado que el hueso constituye un tejido particularmente proclive al acúmulo de Al. (7,8,9); efecto que sería más acentuado en la etapa de crecimiento (8,10). El Al, administrado en varias formas y vías de ingreso, induce una significativa disminución en la ingesta de alimento, y en la ganancia de peso (8, 11, 12,13).

En el hueso, evidencias clínicas y experimentales, han demostrado que altas dosis de Al inhiben la remodelación, disminuyen la actividad de osteoblastos y osteoclastos, producen osteomalacia y alteraciones en la dinámica ósea (14,15,16,17). El efecto sobre la mineralización podría ser directo (18), o una consecuencia de la reducción del número de osteoblastos (17).

El objeto del presente trabajo es analizar, en un modelo de intoxicación crónica, el efecto del hidróxido de aluminio sobre el desarrollo de la masa ósea a través de la excreción urinaria de hidroxiprolina (indicador del turnover óseo) (19), las actividades plasmáticas de fosfatasa alcalina (indicador de actividad osteoblástica) (19) y fosfatasa ácido tartrato resistente (indicador de actividad osteoclastica) (19), y la posible interacción con dos componentes del hueso como son el calcio y el fosfato.

Material y Metodos

Animales y Tratamiento

Se trabajó con dos grupos experimentales:
I. Ratas Wistar machos sometidas a dieta

standard (Nutric, Córdoba, Argentina), con un contenido de Ca y P 1,10 gr y 0,62 gr / 100 gr peso de alimento respectivamente, y libre acceso al agua, fueron expuestas al hidróxido de aluminio por vía i.p. (80 mg/kg de peso, en 0,3 o 0,5 ml de solución fisiológica según el tamaño del animal, tres veces por semana), desde el destete y por períodos de uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis meses, de acuerdo al modelo experimental para el estudio de alteraciones óseas, desarrollado en la cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, UBA (20).

II. Ratas controles, con igual dieta, recibieron un volumen similar de solución fisiológica en idénticos períodos y frecuencia.

Los animales de ambos grupos se mantuvieron a una temperatura controlada (22° C), con un ciclo luz -oscuridad de 12:12 hs

Protocolo Experimental

Se realizaron los siguientes estudios:

1.- Crecimiento

A partir del destete (semana 3^o) se controló semanalmente el peso de los grupos control (n = 12) y tratado (n = 12), por un período de seis meses.

2. Metabolismo óseo

2.1 Excreción de hidroxiprolina

Se recolectó orina de 24 hs, un vez por semana, de los grupos control y tratados, entre las semanas 5^o y 12^o de vida, y luego una vez por mes hasta completar los 6 meses, determinándose la excreción de hidroxiprolina.

2.2 Determinación de la actividad de Fosfatasa Alcalina (FA) y Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (FATR), calcio y fosfato séricos y excreción urinaria de calcio y fosfato

Se obtuvo la actividad de FA y FATR, así como la concentración de aluminio, de calcio y de fosfato séricos, en muestras de sangre obtenidas por punción intracardiaca, en los grupos estudiados al concluir los períodos de 1^o, 2^o, 3^o, 4^o, 5^o y 6^o meses.

El día previo las ratas fueron alojadas indivi-

dualmente en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 24 hs, donde se determinó la excreción de calcio, fosfato y creatinina.

Métodos Analíticos

La hidroxiprolina urinaria fue determinada mediante adsorción e hidrólisis por catálisis heterogénea (21). El calcio fue determinado espectrofotométricamente por la reacción de la cresolftaleina complejona (22). El aluminio plasmático fue medido por espectroscopía de absorción atómica (AAS) electrotérmica (horno de grafito y Espectrómetro Perkin Elmer 5000). El Pi fue medido como fosfomolibdato después de la reducción con ácido ascórbico (23) y la creatinina por el método de Jaffe (24). La actividad de la FATR se obtuvo por método colorimétrico (25), y la actividad de la FA por determinación colorimétrica optimizada (26).

Análisis estadístico

Cada resultado se expresó como la media del grupo \pm SEM. Para controlar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los parámetros analizados de los animales tratados a lo largo de 6 meses, se realizó un análisis de la variancia paramétrico (ANOVA) y un test no paramétrico (Kruskal - Wallis).

Cuando ambos test arrojaron diferencias significativas se informó el p correspondiente al paramétrico porque resulta mas satisfactorio (27). Se establecieron las diferencias con el test de Scheffe y LSD. Las comparaciones estadísticas entre grupos fueron realizados al nivel de significación $\alpha = 0.05$. Un análisis similar se efectuó sobre el grupo control. Para establecer la comparación mes a mes, entre el grupo tratado y el control se aplicó el test «U» de Mann Whitney ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico fue realizado con SPSS (Statistical Package for Social Sciences-1995)

Resultados

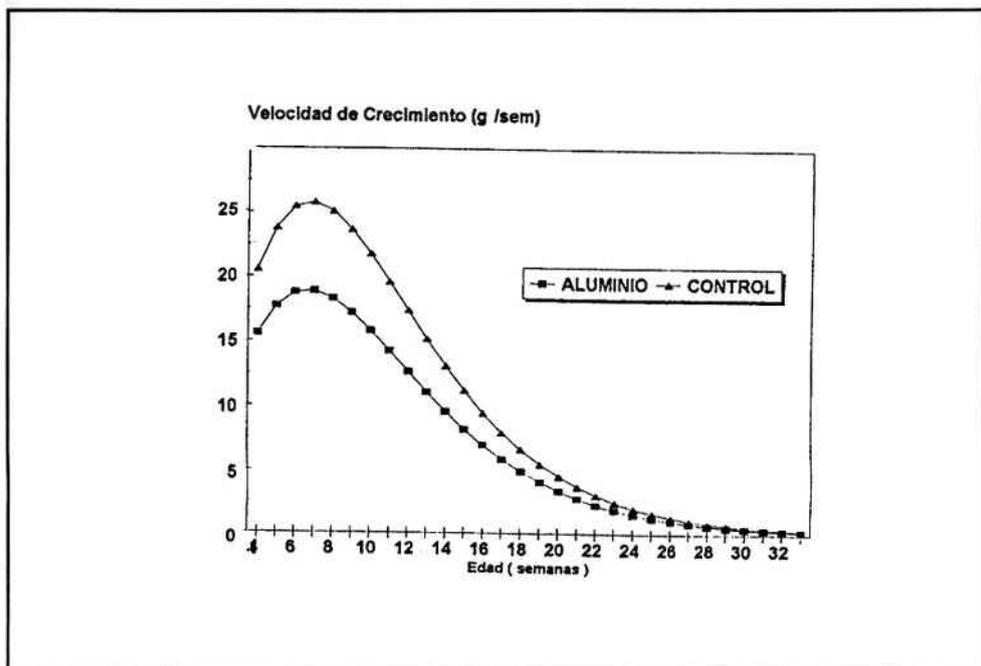
1. Crecimiento

Las ratas tratadas (T) mostraron una disminución significativa del peso corporal (W) alcanzado en la madurez, respecto del grupo control (C): 259,60 \pm 53 g vs 326,5 \pm 12 g ($p < 0,02$). La

diferencia de peso entre ambos grupos se hace significativa ($p < 0.05$) a partir de la semana 10°. Las curvas de velocidad de crecimiento obtenidas a partir de la primera derivada de las curvas de

crecimiento (dW/dt), indican que la tasa máxima coincide para ambos grupos en la 7° semana, siendo menor para el grupo tratado: (T) $19,0 \pm 1,3$ vs (C) $26,4 \pm 1,3$ g/semana ($p < 0.001$). (Fig.1).

Figura 1. Curvas de velocidad de crecimiento del peso corporal.



Fueron obtenidas a partir de la primera derivada de las curvas de crecimiento: $dW/dt = f(t)$. Cada punto representa la media de 12 ratas.

* en el pico de crecimiento diferencia significativa respecto del grupo control ($p < 0.001$)

2. Metabolismo oseo

2.1 Excreción urinaria de hidroxiprolina

El análisis gráfico de la excreción urinaria de hidroxiprolina en 24 hs (Fig.2) muestra que para ambos grupos, los valores máximos de excreción se alcanzan en la semana 7° de vida, lo que indicaría que las curvas de velocidad de crecimiento y excreción de hidroxiprolina están en fase.

Comparando las series cronológicas de las medias de excreción de hidroxiprolina de ambos grupos, se observa en las ratas tratadas, un aumento significativo en el 6° mes de tratamiento.

2.2 Excreción de Calcio y Fosfato urinario

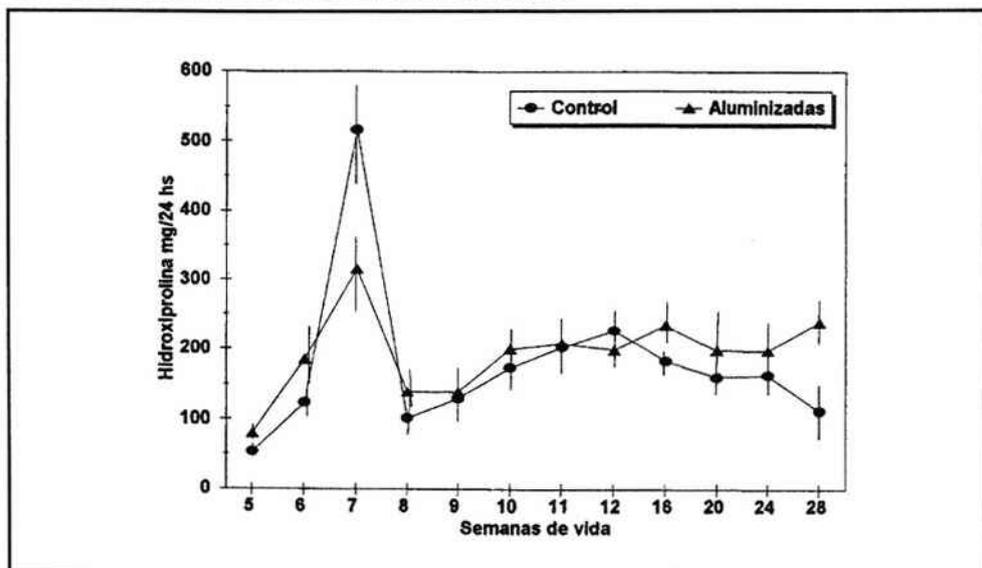
ción de calcio y fosfato en los grupos tratados y controles, a través de los meses estudiados.

En el análisis de la serie cronológica de los grupos tratados se puede constatar una reducción significativa de la excreción urinaria de calcio a partir del segundo período controlado, que va acompañado de un aumento significativo de la excreción urinaria de fosfato. Un patrón similar se observa en los grupos controles.

El Al aumentó significativamente la excreción urinaria de calcio a partir del 2° período controlado, efecto que fue acompañado de una reducción en las excreción de fosfato, solo significativa en los tres primeros períodos examinados. No se observaron variaciones en las concentraciones séricas de calcio y fosfato en los distintos períodos.

La tabla 1 muestra las variaciones en la excre-

Figura 2. Excreción urinaria de hidroxiprolina en función del tiempo.



Los puntos designados como control y aluminio representan el valor medio \pm SEM de 10 ratas por grupo.

Las comparaciones entre los grupos control y tratado fue realizado por test «U» de Mann-Whitney con un nivel de significación $\alpha = 0,05$

* diferencia significativa respecto del grupo control ($p < 0,004$)

Tabla 1. Influencia del aluminio sobre la excreción urinaria de calcio y fosfato

Meses controlados	Ca /Creatinina mg/g		Pi mg/24 hs	
	C (n = 5)	Al (n = 6)	C (n=5)	Al (n = 6)
1	42,30 \pm 3,9	37,87 \pm 3,31	12,64 \pm 0,56	9,65 \pm 0,81 *
2	13,17 \pm 0,45	24,48 \pm 2,06 *	19,09 \pm 1,54	13,90 \pm 1,27 *
3	14,86 \pm 1,25	24,63 \pm 1,90 *	18,99 \pm 0,86	13,36 \pm 0,92 *
4	14,64 \pm 1,71	21,17 \pm 1,45 *	18,23 \pm 1,21	13,85 \pm 1,07
5	14,89 \pm 2,01	23,08 \pm 1,59 *	17,38 \pm 0,73	13,07 \pm 1,33
6	14,50 \pm 1,62	30,81 \pm 4,41 *	18,62 \pm 1,31	15,82 \pm 0,73
Analisis de la Variancia	$p = 0,0001$	$p = 0,0001$	$p = 0,00001$	$p = 0,005$

Ratas tratadas recibieron hidróxido de aluminio (80 mg/kg peso i.p) tres veces por semana durante periodos de 1, 2, 3, 4, 5, y 6 meses. n: número de ratas. C: grupo control Al: grupo tratado con aluminio.

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

Las variaciones cronológicas de cada parámetro en cada grupo fue realizada por aplicación de un ANOVA y test de Kruskal-Wallis con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los (p) respectivos figuran al pié de la tabla y nos indican diferencias significativas.

Las comparaciones mes a mes, entre los grupos control y tratado fue realizado por el test «U» de Mann Whitney. La existencia de diferencias significativas en el mismo se indican con (*), y el (p) resultante en los casos señalados fue siempre $< 0,03$.

2.3. Marcadores óseos séricos y aluminemia

Los datos pueden observarse en la tabla 2. El análisis cronológico de la actividad de la FA sérica, tanto en el grupo control como en el tratado, reflejan valores aumentados significativamente en el primer período controlado, que luego se reducen. Lo mismo podemos observar en la actividad de la FATR. Estas variaciones constituyen modificaciones fisiológicas

observadas durante el período de crecimiento en la rata.

De la comparación entre los grupos tratados y los controles, sólo surgen efectos significativos del Al en la actividad de FA, en los dos primeros meses controlados, sin modificación de la actividad de la FATR. La concentración de Al sérico se incrementó a lo largo del tratamiento.

Tabla 2. Efecto del aluminio sobre los marcadores óseos séricos

Meses controlados	F.A. U/l		F.A.T.R. U/l		Al $\mu\text{g/l}$	
	C (n = 6)	Al (n = 6)	C (n = 6)	Al (n = 6)	C (n = 6)	Al (n = 6)
1	309,00 \pm 14,99	217,78 \pm 8,53*	11,93 \pm 0,15	12,20 \pm 0,55	10 \pm 2,5	135 \pm 12**
2	198,00 \pm 8,82	158,88 \pm 4,63*	7,15 \pm 0,32	7,82 \pm 0,49	12 \pm 2,0	260 \pm 19**
3	167,64 \pm 9,15	144,72 \pm 7,22	7,54 \pm 0,23	7,02 \pm 0,36	10 \pm 1,0	484 \pm 17**
4	138,50 \pm 10,52	109,58 \pm 7,99	9,90 \pm 0,50	9,06 \pm 0,34	13 \pm 1,5	610 \pm 18**
5	115,20 \pm 8,53	95,70 \pm 7,81	10,50 \pm 0,78	9,89 \pm 0,69	13 \pm 2,5	804 \pm 19**
6	97,60 \pm 7,68	83,13 \pm 7,38	11,27 \pm 0,73	10,92 \pm 0,75	15 \pm 3,5	906 \pm 25**
Análisis de la Variancia	p=0,00008	p=0,00001	p=0,00001	p=0,0001	N.S.	p=0,001

Ratas tratadas: recibieron hidróxido de aluminio (80 mg/kg peso i.p) tres veces por semana durante períodos de 1, 2, 3, 4, 5, y 6 meses. n: número de ratas. C: grupo control Al: grupo tratado con aluminio

F.A. Fosfatasa Alcalina FATR: Fosfatasa Acida Tartrato Resistente Al: concentración sérica aluminio

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

Las variaciones cronológicas de cada parámetro, en cada grupo fue realizada por aplicación de un ANOVA y test de Kruskal-Wallis con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los (p) respectivos figuran al pie de la tabla y nos indican diferencias significativas.

Las comparaciones mes a mes, entre los grupos control y tratado fue realizado por el test «U» de Mann Whitney.

La existencia de diferencias significativas en el mismo se indican con: * ($p < 0,009$) ** ($p < 0,001$)

Discusión

El Al altera el desarrollo corporal, efecto puesto en evidencia en la disminución significativa del peso corporal a partir de la semana 10^o de vida, sin modificar la velocidad de crecimiento. El retardo encontrado en la evolución de peso, coincide con las observaciones de otros autores, que trabajaron con Al administrado por diferentes vías y en formas variadas (8,11,12,28).

Los marcadores bioquímicos óseos proveen información sobre la dinámica de la formación y resorción ósea. La reducción observada en la concentración sérica de FA, indicaría que el Al afecta

la formación ósea, particularmente en el período de crecimiento de la rata. Esto coincide con la información que muestra la toxicidad del Al sobre los osteoblastos, provocando reducción de su número (16, 18).

La FATR, de origen osteoclástico, cuya concentración en sangre es proporcional a la cantidad de hueso resorbido no experimentó cambios por el Al, aunque hay trabajos que sugieren una reducción del número de osteoclastos (16,17).

La actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos está normalmente acoplada, y las variaciones de sus concentraciones séricas estarían reflejando la tasa general de crecimiento. El hallazgo

de una reducción en la actividad de FA en el período de crecimiento, coincide con la menor variación del peso (dW/dt) observado en la semana 7ª por acción del Al. Distintos estudios han demostrado la correlación entre los niveles urinarios de hidroxiprolina y la resorción ósea (29), y su excreción es frecuentemente utilizada como indicador del turnover óseo. La variación de la misma observada en ambos grupos, demuestra que acompaña al fenómeno de crecimiento, aumentando significativamente en las ratas tratadas la concluir la intoxicación. Este hecho podría mostrar un desacople entre la actividad de osteoblastos y osteoclastos, aunque no se observen cambios manifiestos en la actividad de FATR y FA. Se ha demostrado que las ratas en crecimiento retienen mucho más Al en el hueso que las ratas adultas (10). La intoxicación continuada de los animales desde el destete determinaría la presencia de importantes depósitos de aluminio en hueso en la etapa adulta (30), que podrían ser responsables del efecto observado.

La mayor excreción de calcio observada en ambos grupos, al concluir el primer mes, correspondería al mayor turnover óseo del período de crecimiento rápido. Los valores reducidos en la excreción de fosfato podrían estar vinculados al aumento del balance de fosfato que habitualmente se observa en dicho período. La necesidad de fosfatos disminuiría durante el período de crecimiento lento, lo que llevaría a un aumento en la excreción del mismo.

La administración crónica de Al indujo un aumento en la excreción de calcio, que fue acompañada de una reducción en la excreción de fosfatos, solo significativa en los primeros tres períodos controlados. Esta reducción concuerda con las observaciones referidas a un aumento del transporte tubular máximo de fosfato producido por el aluminio en túbulos renales (30). Un desorden en el metabolismo del calcio, con un aumento en su excreción ha sido observado en animales sometidos a intoxicación con aluminio por vía oral (31). No obstante, otros trabajos encuentran una disminución en la excreción de dicho elemento tras la administración prolongada de aluminio por vía oral (32). El Al depositado en el hueso podría reducir la mineralización y causar la movilización de calcio desde el mismo, observándose un incremento en su excreción si la función renal no está alterada. Algunos estudios «in vivo» e «in vitro» muestran que el Al inhibe la mineralización (18,33,34), siendo responsable de una disminución de la velocidad de deposición ósea y turnover óseo (35).

Estos efectos sobre el calcio y fosfato, podrían además tener su origen en la inhibición observada en la secreción de PTH por exposición al Al (36,37), que va acompañada con una reducción en la excreción de AMPc nefrogénico (30), lo que implicaría una disminución de la capacidad fosfatúrica a nivel renal.

Los resultados de este estudio sugieren que el aluminio además de inducir cambios en el crecimiento corporal, actuaría sobre el turnover óseo, modificando la actividad osteoblástica y el metabolismo del calcio y fosfato. La competición con ciertos elementos, como los estudiados (calcio y fosfato) podría ser uno de los mecanismos que explicarían en parte la toxicidad del aluminio, y que serían particularmente relevantes durante el período de crecimiento.

Agradecimientos

Trabajo realizado con fondos de la Fundación Roemmers y de la Universidad Nacional del Litoral a través de la Programación C.A.I.+D. Se agradece el apoyo técnico prestado por la Lic. Elena de Carrera y el Dpto de Matemáticas, Facultad Bioquímica y Cs Biológicas con el estudio estadístico.

Bibliografía

- 1- Salusky, I.B., Coburn, J.W., Paunier, L., Sherrard, D.J., and Fine, R.N. 1984. Role of aluminum hydroxide in raising serum aluminum levels in children undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J.Pediatr.* **105**:717-720
- 2- Warady, B.A., Ford, D.M., Gaston, C.E., Sedman, A.B., Huffer, W.E., and Lum, G.M. 1986. Aluminum intoxication in a child: treatment with intraperitoneal desferrioxamine. *Pediatrics* **78**: 651-655
- 3- Sedman, A.B., Miller, N.L., Warady, B.A., Lum, G.M. and Alfrey, A.C. 1984. Aluminum loading in children with chronic renal failure. *Kidney Int.* **26**: 201-204.
- 4- Chedid, F., Fudge, A., Teuber, J., James, S.L. and Simmer, K. 1991. Aluminium absorption in infancy. *J.Paediatr. Child Health* **27**:164-166.
- 5- Von Stockhausen, H.B., Schrod, L., Bratter, P., and Rosick, U. 1990. Aluminium loading in premature infants during intensive care as related to clinical aspects. *J.Trace Element Electrolytes Health Dis.* **4**:209-213.
- 6- Golub, M.S. and Domingo, J.L. 1996. What we know and what we need to know about developmental aluminum toxicity. *J. Toxicol.Environ. Health.* **48**: 585-597.
- 7- Greger, J.L., and Powers, C.F. 1992. Assessment of exposure

- to parenteral and oral aluminum with and without citrate using desferrioxamine test in rats. *Toxicology*. **76**: 119-132.
- 8-** Yokel R.A., McNamara P.J. 1985: Aluminum bioavailability and disposition in adult and immature rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **77**: 344-352
- 9-** Goodman, W.G., Henry, D.A., Horst, R., Nudelman, R.K., Alfrey, A.C., Evans, R.A.: 1983: Parenteral aluminum administration in the dog. Induction of osteomalacia and effect on vitamin metabolism. *Kidney Int.* **25**: 370-372
- 10-** Greger, J.L., and Radzanowski G.M. 1995. Tissue aluminium distribution in growing, mature and ageing rats: relationship to changes in gut, kidney and bone metabolism. *Fd Chem. Toxic.* **33** (10) 867-875
- 11-** Bertholf, R., Herman, M., Savory, J., Carpenter, R., Sturgill, C.B., Katselos Vandenberg, S., Wills, M. 1989: A long-term intravenous model of aluminum maltol toxicity in rabbits: tissue distribution, hepatic, renal and neuronal cytoskeletal changes associated with systemic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **98**:58-74.
- 12-** Domingo, J.L., Llobet, J.M., Gomez, M., Tomas, J.M., Corbella, J. 1987a: Nutritional and toxicological effects of short-term ingestion of aluminum by the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **56**: 409-419.
- 13-** Golub, M.S., Gerschwin, Me., Donald, J.M., Negri, S., Keen, C.L. 1987: Maternal and developmental toxicity of chronic aluminum exposure in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **8**: 346-357
- 14-** Jeffery, E.H., Abreo, K., Burgess, E., Cannata, J., Greger, J.L. 1996: Systemic aluminum toxicity: Effects on bone, hematopoietic tissue and kidney. *J.Toxic. Envir. Health.* **48**: 649-665.
- 15-** Andress, D.L., Maloney, N.A., Endres, D.B., Sherrard, D.J. 1986: Aluminum-associated bone disease in chronic renal failure: high prevalence in a long-term dialysis population. *J.Bone Min. Res.* **1**: 391-398.
- 16-** Ballanti, P., Mocetti, P., Della Rocca, C., Bonucci, E., Constantini, S., Giordano, R., Ioppolo, A., Mantovani, A. 1989: Experimental aluminum intoxication and parathormone: Effects on the mineralization process. *Miner. Electrolyte Metab.* **15**: 233-240.
- 17-** Robertson, J.A., Felsenfeld, A.J., Haygood, C.C., Wilson, P., Clarke, C., Llach, F.:1983. An animal model of aluminum-induced osteomalacia: Role of chronic renal failure. *Kidney Int.* **23**: 327-335.
- 18-** Rodriguez, M., Felsenfeld, A.J., Llach, F. 1990: Aluminum administration in the rat separately affects the osteoblast and bone mineralization. *J. Bone Min. Res.* **5**: 59-67
- 19-** Taylor, A., Lueken, S.A., Libanati C., Baylink D. 1994: Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* **20** (3): 589-607
- 20-** Degiorgis, N., Itoiz, M.E., Cabrini R.L. 1987: Modelo experimental para el estudio de las alteraciones óseas producidas por aluminio. *Actas II Congreso Osteología y Metabolismo Mineral. Argentina.* p.19
- 21-** Nobbs, B.T., Walker A.W., Davis T.J. 1975. Assay of urinary hydroxyproline based on resin-catalysed hydrolysis. *Clin Chim Acta.* **64**, 219-221.
- 22-** Rojkin, M.L., Marian, M.C.O. 1973: Determination of calcium. *Bioquim.Clin.VII/4*: 405-413
- 23-** Chen, P.S., Toribara, T.Y., Warner, H. 1956: Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**: 1756-1758.
- 24-** Henry, R.J. 1964. *Clinical Chemistry. Principles and Techniques.* Harper and Row. New York
- 25-** Fishman, W., Davidsohn, H.M. 1957: Determination of serum acid phosphatase. *Methods of Biochemical Analysis.* Glick D. N.Y. Acad. Press. pp 257
- 26-** Mc Comb and Bowers. 1972. Determination of alkaline phosphatase. *Clin.Chem.* **18/2**: 97
- 27-** Altman, D. 1997: *Practical Statistics for Medical Research.* Chapman-Hall. 7ª Edición. U.K.
- 28-** Cherroret, G., Desor, D., Hutin, M.F., Burnel, D., Capolaghi, B., Lehr, P.R. 1996: Effects of aluminum chloride on normal and uremic adult male rats. Tissue distribution, brain acetyltransferase activity, and some biological variables. *Biol.Trace Elem. Res.* **54**:(1) 43-53.
- 29-** Charles, P., Poser, J.W., Mosekilde, L. 1985. Estimation of bone turnover evaluated by ⁴⁷Ca kinetics: Efficiency of serum bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, serum alkaline phosphatase, and urinary hydroxyproline excretion. *J.Clin Invest* **76**:2254-2259
- 30-** Mahieu S., Calvo M.L. 1998. Effect of chronic poisoning with aluminum on the renal handling of phosphate in the rat. *Toxicology Letters.* **94**: 57-6
- 31-** Chmielnicka, J. And Nasiadek, M. 1991. Tissue distribution and urinary excretion of essential elements in rats orally exposed to aluminum chloride. *Biol. Trace Elem. Res* **31**: 131-138
- 32-** Sanchez, D.J., Gomez, M. Llobet, J.M., Corbella, J., Domingo, J.L. 1997. Effects of aluminium on the mineral metabolism of rats in relation to age. *Pharmacol. Toxicol.* **80** (1):11-17
- 33-** Blumenthal, N.C., Posner, A.S.: In vitro model of aluminum induced osteomalacia: inhibition of hydroxyapatite formation and growth. *Calcif. Tissue Int.* **36**: 439-441, 1984.
- 34-** Bushinsky, D.A., Sprague, S.M., Gallegot, P., Girod, C., Chabala, J.M. Levisetti, R. 1995. Effects of aluminum on bone surface ion composition. *J. Bone Min. Res.* **10**: 1988-1997.
- 35-** Mahieu, S., Calvo, M.L., Millen, N., Gonzalez, M. Y Contini M Del C. 1998. Crecimiento y Metabolismo del Calcio en Ratas Sométicas a Intoxicación Crónica con Hidróxido de Aluminio. *APPTLA.* **48**. 1: 32-40.
- 36-** Balsan, S., Sachs, C. 1987: Parathyroid response to aluminum in vitro: ultrastructural changes and PTH release. *Kidney Int.* **31**: 15-24.
- 37-** Morrisey, J., Rothestein, M., Mayor, G., Slatopolsky, E. 1983: Suppression of parathyroid hormone secretion by aluminum. *Kidney Int.* **23**: 699-704.