

Alteraciones en la función renal inducidas por el aluminio

Mahieu, Stella; Millen, Néstor; Elías, María Mónica*

Cátedra Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo. (3000). Santa Fe. Argentina.

*Cátedra Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.
e-mail: smahieu@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se estudió el desarrollo de nefrotoxicidad en ratas tratadas desde el destete con hidróxido de aluminio (Al) (27 mg/kg peso i.p. 3 veces por semana - Al elemental) al concluir el 1º, 2º, 3º y 4º mes de exposición. Los homogenados renales mostraron una acumulación progresiva de Al, con reducción de la actividad de la Glutacion-S-transferasa a partir del 1º mes, un aumento de malonildialdehído como medida de lipoperoxidación desde el 2º y una disminución de sulfidrilos no proteicos (Glutacion) a partir del 3º.

Al 4º mes no hubo cambios en la velocidad de filtrado glomerular, ni en el flujo plasmático renal, observándose una reducción en la EF%Na, con aumento de la fosfatasa alcalina urinaria. La proteinuria aumentó desde el 2º mes con incremento de albúmina y de bandas con movilidad electroforética cercanas a 45-50 y 80 kDa. La excreción de creatinina se redujo y Gamma glutamil transpeptidasa aumentó en el 4º mes.

La intoxicación crónica con Al por vía parenteral indujo una serie de alteraciones a nivel renal que comprenden a los sistemas metabólicos, la excreción de proteínas y mas tardíamente la de creatinina, con cambios en la función tubular sin afectar la función glomerular.

Palabras claves: aluminio, ratas, función renal, sistemas metabólicos, proteinuria

SUMMARY: Aluminum elicits alterations on renal function. We have examined the effects of aluminum on the development of nephrotoxicity in rats which were treated with aluminum hydroxide (27 mg/kg b.w. ip three times a week - elemental aluminum) since weaning and the end of the 1º, 2º, 3º, and 4º months. The aluminum content of renal tissue increased in treated animals. Significant changes occurred in Glutacion-S-transferase whose activity decreased from the first month. The aluminum caused accelerated lipid peroxidation as reflected by increases malonildialdehyde from the second month. The renal non-protein-sulphydryls (mainly GSH) decreased from the third month. No changes were observed in glomerular filtration rate, or in renal plasmatic flow on the fourth month. Nevertheless, the FE% Na were significantly lower and the urinary alkaline phosphatase increased.

The urinary protein was increased from 2 month, with increased in albumin band and bands with electrophoretic mobility corresponding to MW near 80 kDa and 45-50 kDa. Urinary excretion of creatinine was shown to decrease from the 4 month with an increase in urinary Gamma glutamil transpeptidase.

The chronic intoxication with aluminum by parenteral exposition induces some alterations at a renal level that is composed of metabolic systems, proteins excretion and later on the excretion of creatinine and the enzymes from brush border membrane, whit changes in the tubular function without affecting the glomerular function.

Keywords: aluminum, rats, renal function, metabolic systems, urinary protein

Introducción

Si bien es conocido el efecto de la función renal sobre la acumulación de aluminio (Al) en distintos órganos con su consiguiente toxicidad sistémica, no existen muchas referencias acerca de una acción nefrotóxica del mismo.

Diversas investigaciones han demostrado acumulación de Al tanto en tejidos clásicos como hueso, cerebro, hígado, así como en riñón (1,2,3). Esta acumulación se observa no solo como consecuencia de una insuficiencia renal (4,5) sino también que parece estar vinculada al deterioro que experimenta la función renal con la edad (5,6). El aluminio acumulado en riñón puede generar efectos adversos como degeneración en las células tubulares renales, llevando a los autores a sugerir que el Al podría ser causa de nefrotoxicidad (7,8,9).

Datos preliminares fueron presentados en XLIII Reunión Anual Sociedad Argentina Investigación Clínica. Mar del Plata. 1998

Recibido Mayo 2001, aceptado Julio 2001

Por otra parte en nuestro laboratorio se han descrito cambios funcionales renales tales como un aumento en la reabsorción tubular de fosfatos inducido por la administración crónica de Al por vía ip (10), mientras otros autores reportan que la infusión del catión provoca un efecto opuesto (11). Así mismo se ha observado un aumento en la excreción de proteínas en ratas que consumen altas dosis de Al (6).

El objetivo de este trabajo fue analizar en un modelo de intoxicación crónica los efectos secuenciales de la administración de hidróxido de aluminio sobre la función renal durante un período de 4 meses a partir del destete, a través del estudio de indicadores de daño oxidativo en tejido, y de valores de función a partir de técnicas de clearance y de parámetros sistémicos y urinarios vinculados a dicha función.

Materiales y Métodos

Animales y Tratamiento

Se trabajó con ratas Wistar machos sometidas a dieta standard y libre acceso al agua. Fueron divididas en dos grupos experimentales.

1. Ratas intoxicadas por vía ip con una dosis de aluminio elemental de 27 mg/kg peso (bajo la forma de hidróxido de aluminio) en 0,3 o 0,5 ml de solución fisiológica según la edad del animal, tres veces por semana, desde el destete y por períodos de 1,2,3 y 4 meses.

2. 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 temperatura controlada (22°C) con un ciclo luz-oscuridad 12:12 hs.

Procedimiento Experimental

Se realizaron los siguientes estudios:

1. Control del peso corporal

2. Al completar cada período, animales de cada grupo fueron colocados en jaulas metabólicas para la obtención de orina de 24 hs, con el fin de determinar la excreción de creatinina, proteínas y de la enzi-

ma Gamma Glutamyl Transferasa (g GT). Estos parámetros fueron seleccionados como indicadores del filtrado glomerular y de la integridad del ribete en cepillo del túbulo contorneado proximal.

3. A continuación los animales fueron anestesiados con pentobarbital, se realizó una extracción de sangre por punción cardiaca, y sus riñones fueron removidos rápidamente y preparados para determinar la actividad de la enzima Glutation S Transferasa (GST) en la fracción citosólica, el contenido de compuestos sulfidrilos no proteicos (fundamentalmente Glutation - GSH), y malonildialdehído (MDA) como medida de lipoperoxidación, así como el contenido de aluminio tisular.

4. Animales de ambos grupos (tratado y control) al cumplir el cuarto mes de tratamiento fueron preparados para el estudio de la función renal con técnicas de clearance. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso). La vena y la arteria femoral fueron cateterizadas (PE 50) y un cateter fue insertado en vejiga por incisión suprapúbica. Los animales se mantuvieron en jaulas de contención durante todo el experimento. Por vena femoral se infundió una solución conteniendo inulina (1 gr/100 ml), p-aminohipurato de sodio (0.3 g/100 ml) y D-manitol (5 g/100 ml) usando una bomba de infusión a velocidad constante 5 ml/h (Sage Instruments, model 341-B). Después de un período de equilibración de una hora, se obtuvieron muestras de orina durante dos períodos de 30 minutos y muestras de sangre por arteria femoral en el medio de cada período.

Se midió el volumen urinario por gravimetría y se determinaron la velocidad de filtrado glomerular (VFG) por el clearance de inulina, y el flujo plasmático renal cortical a través del clearance de p-aminohipurato (Cl PAH). Las excreciones fraccionales de agua, sodio y potasio se obtuvieron por fórmulas convencionales. En las muestras de orina se determinó la actividad de fosfatasa alcalina (FA), expresándola por mg de inulina excretada.

Métodos Analíticos

La determinación de GST se efectuó en la fracción citosólica obtenida por centrifugación de homogenados en buffer conteniendo EDTA 0,001M, Na_2HPO_4 0.03M y sacarosa 0.25M (pH:7,4), por el método de Goldstein y Combes (12) con 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno como sustrato.

La determinación de sulfidrilos no proteicos (mayoritariamente GSH) se realizó en homogenados preparados con tricloroacético al 5% en CIH 0,01M y medido según Ellman (13). MDA fue cuantificado en homogenados en KCl 1,15% usando ácido tiobarbitúrico (ATB) de acuerdo al método de Ohkawa (14).

Las enzimas FA y gGT urinarias fueron determinadas por métodos cinéticos. Creatinina y urea en plasma y orina fueron determinadas por métodos colorimétricos.

Na y K fueron determinados por fotometría de llama. Las concentraciones de PAH en suero y orina fueron determinados por el método de Brun modificado por Waugh y Beall (15). Las concentraciones de inulina en las mismas muestras se determinaron por el método de Roe (16). La osmolaridad sérica fue obtenida por microsmómetro de presión de vapor (Wescor), y el Al por espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito.

Muestras de orina de 24 hs se corrieron en SDS-Page al 10% para la caracterización de las proteínas.

Análisis Estadístico

Cada resultado se expresó como la media del grupo \pm SEM. Se examinó la existencia de diferencias significativas entre las medias de los parámetros con un análisis de la variancia paramétrico y un test no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguidos de los tests de Scheffe y LSD. La comparación entre grupos fueron realizados al nivel de significación $\alpha = 0.05$. En la comparación mes a mes se aplicó el test «U» de Mann Whitney.

El análisis estadístico fue realizado con SPSS-1995.

Resultados

No se observaron signos evidentes de alteraciones en las ratas tratadas con Al, ni una reducción significativa del peso corporal, no obstante existió una acumulación progresiva del metal en el tejido renal, comprobándose al 4º mes de tratamiento una reducción significativa del peso de ambos riñones (tabla 1).

La administración de Al disminuyó significativamente la actividad de GST a partir del primer mes de tratamiento. Si bien se observó un incremento en el 2º mes este se mantuvo por debajo de la actividad de la enzima en el grupo control. En los 3º y 4º periodos estudiados la actividad enzimática continuó decreciendo (Fig. 1-A).

El contenido de MDA como medida de lipoperoxidación in vivo aumentó significativamente a partir del 2º mes de tratamiento (Fig 1-B), mientras que el de GSH en los animales tratados se redujo a partir del 3º mes del tratamiento con Al. (Fig. 1-C).

Los parámetros plasmáticos estudiados no mostraron variaciones por efecto del aluminio (tabla 2). En el 4º mes (tabla 3), podemos observar una reducción significativa de la excreción de creatinina que va acompañada de un incremento significativo de gGT (enzima del ribete en cepillo del túbulo proximal).

La excreción de proteínas se incrementó significativamente a partir del 2º mes de tratamiento. La Fig 2 muestra la imagen de una corrida de orina en gel de poliacrilamida donde se observa un aumento en la banda de albúmina y en las bandas con movilidad electroforética que corresponden a pesos moleculares cercanos a 45-50 y 80 kD.

No se observaron diferencias en los parámetros de la función renal entre los grupos al 4º mes de tratamiento. Sin embargo hubo una reducción significativa de la EF%Na, con un aumento de EF%H₂O no significativo, en los animales tratados. Esto fue acompañado con un aumento de la excreción de FA (enzima del ribete en cepillo de células tubulares).

Tabla 1. Evolución del peso corporal y renal, y del contenido de aluminio renal durante 4 meses

| | | Peso Corporal g | Peso Renal g | Aluminio µg/g tej.húmedo |
|--------|----------|--------------------|-----------------|-----------------------------|
| 1º Mes | C n = 10 | 186 ± 4 | 1.54 ± 0.03 | 4.1 ± 0.3 |
| | T n = 10 | 170 ± 3 | 1.37 ± 0.04 | 39.2 ± 0.6 * |
| 2º Mes | C n = 10 | 267 ± 7 | 1.73 ± 0.07 | 4.5 ± 0.2 |
| | T n = 10 | 277 ± 4 | 1.88 ± 0.05 | 48.1 ± 0.5 * |
| 3º Mes | C n = 10 | 335 ± 10 | 2.15 ± 0.04 | 4.9 ± 0.7 |
| | T n = 10 | 337 ± 4 | 2.10 ± 0.01 | 99.5 ± 1.6 * |
| 4º Mes | C n = 10 | 409 ± 20 | 2.65 ± 0.01 | 4.8 ± 0.5 |
| | T n = 10 | 362 ± 10 | 2.32 ± 0.05 * | 260.1 ± 7.9 * |
| ANOVA | | p < 0.0001 | p < 0.005 | p < 0.0000 |

Ratas tratadas recibieron hidróxido de aluminio (80 mg/ kg peso ip) tres veces por semana durante periodos de 1,2,3 y 4 meses.
C: control, T: tratadas, n: número de animales

Los resultados se expresan como media ± SE M

Se aplicaron ANOVA y Kruskal-Wallis con un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Las comparaciones mes a mes entre grupos controles y tratados fue realizado por el test «U» de Mann Whitney.

* diferencia significativa p < 0.05 entre controles y tratadas en igual tiempo

Tabla 2. Efecto del aluminio sobre parámetros sistémicos

| | | Urea mg/dl | Creatinina mg/dl | Proteínas g/dl | Osmolaridad mOsm/l |
|--------|----------|---------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| 1º Mes | C n = 12 | 34.0 ± 1.2 | 1.00 ± 0.03 | 6.6 ± 0.05 | 293.4 ± 1.6 |
| | T n = 13 | 32.8 ± 1.3 | 0.97 ± 0.03 | 6.5 ± 0.10 | 290.9 ± 1.6 |
| 2º Mes | C n = 17 | 33.6 ± 0.8 | 0.99 ± 0.04 | 6.6 ± 0.06 | 293.1 ± 1.8 |
| | T n = 16 | 32.1 ± 0.8 | 1.02 ± 0.03 | 6.5 ± 0.05 | 292.4 ± 3.4 |
| 3º Mes | C n = 10 | 33.9 ± 1.4 | 0.95 ± 0.03 | 6.9 ± 0.05 | 296.3 ± 2.0 |
| | T n = 14 | 35.6 ± 1.5 | 0.93 ± 0.02 | 6.9 ± 0.05 | 295.8 ± 1.5 |

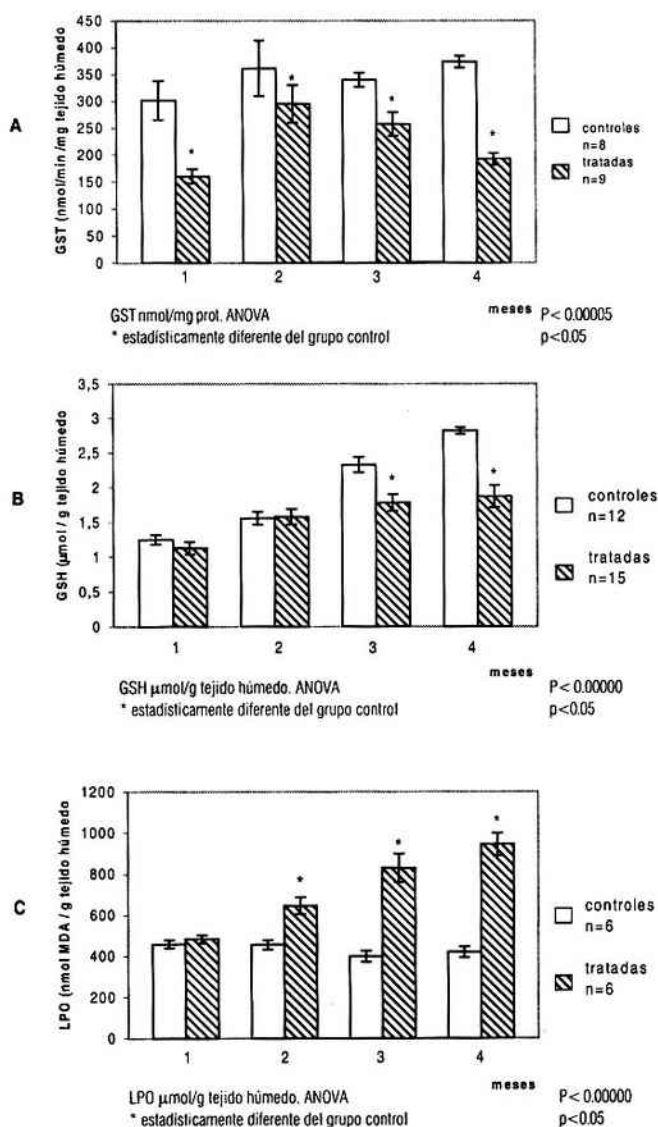
Ratas tratadas recibieron hidróxido de aluminio (80 mg/ kg peso ip) tres veces por semana durante periodos de 1,2 y 3 meses.

C : control, T: tratadas, n: número de animales

Los resultados se expresan como media ± SE M

Se aplicaron ANOVA y Kruskal-Wallis con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

Fig. 1: Actividad de Glutation-S-Transferasa (GST) [A], contenido de sulfidrilo no proteicos (GSH) [B] y de malonilaldehído como medida de lipoperoxidación (LPO) [C] en homogenados renales a 1, 2, 3 y 4 meses de tratamiento con aluminio.



Discusión

Nuestros datos muestran que la administración de hidróxido de aluminio por vía parenteral desde el destete y por 4 meses determina una acumulación progresiva del metal en el tejido renal produciendo cambios metabólicos y funcionales secuenciales y una reducción del peso renal. La relación temporal de las modificaciones en el metabolismo indicaría que el Al puede iniciar una secuencia específica de eventos. Como efecto temprano observamos una reducción de la actividad de GST en el primer mes de tratamiento, que si bien luego se incrementa en el mes siguiente, no alcanza los niveles del grupo control y con el tiempo decae. A partir del 2º mes de tratamiento observamos que el Al acelera la peroxidación lipídica hecho reflejado en un aumento de los niveles de MDA. Como evento tardío se presentaría una reducción de GSH.

GST juega un papel importante en el metabolismo de xenobióticos y de detoxificación y su actividad se incrementa con la edad (17). El Al reduciría la actividad de esta enzima pero no impediría el incremento producido con la edad en los primeros meses. Cuando los niveles tisulares de Al aumentan, declina en forma paulatina la actividad enzimática.

A diferencia de otros metales el Al no tiene afinidad por los grupos sulfidrilos y no se conjugaría con GSH, por lo que la reducción observada podría deberse a un exceso de oxidaciones, a un aumento del turnover o a una reducción en su síntesis. Evidencias experimentales sugieren que la LPO está implicada en el mecanismo de toxicidad de distintos xenobióticos y de agentes que reducen el glutatión (18). En nuestro caso la deplección de GSH podría estar asociada al incremento de LPO. La acumulación de Al a nivel tisular desencadenaría un stress oxidativo que sería responsable de la reducción de los niveles de GSH. El Al administrado en forma aguda por vía ip induce a nivel hepático una secuencia de eventos que comienzan con una reducción temporal de GSH, un incremento de hemooxigenasa con reducción del citocromo P450 y recién como efecto tardío un incremento en la liperoxidación, no siendo estos cambios, aparentemente, primeros responsables del daño oxidativo (19). Por otra parte la administración crónica de Al induce en hígado una

reducción de la actividad de GST, del citocromo P 450 y tardíamente de GSH (20).

Como en trabajos previos, no observamos efecto el aluminio sobre la VFG, ni el flujo plasmático renal cortical estimado a través del clearance de PAH (10) pero si comprobamos una reducción en la EF%Na que no va acompañada de cambios significativos en EF%H₂O. Si bien la función renal y los niveles tisulares de GSH están relacionados (21), la disminución de GSH observada no sería suficiente para desencadenar los efectos sobre la excreción de Na.

La ausencia de cambios en la VFG, así como el aumento en la reabsorción de fosfatos observado en trabajo previo (10), junto a la aparente disociación en la excreción de agua y sodio nos llevarían a pensar que quizás algunos de los efectos del aluminio podrían estar vinculados al nefrón distal, por lo que se plantea la necesidad de estudiar el efecto del aluminio sobre la capacidad de concentración y dilución de la orina, así como la respuesta renal a arginina vasopresina (AVP) y la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Por otra parte, el incremento observado en la excreción de proteínas, sin cambios en su concentración plasmática y la presencia de una banda pronunciada de albúmina sugeriría que la función de barrera de filtración no estaría bien conservada en estos animales, o bien que estaría limitada la capacidad de reabsorción a nivel tubular. En este sentido el aumento de enzimas del ribete en cepillo (gGT y FA) excretadas estarían indicando un posible daño tubular. Dosis elevadas de aluminio inducen cambios patológicos en el túbulo proximal que incluyen el aumento del tamaño y número de lisosomas, vacualización de organelas y daño mitocondrial (22).

A pesar de no existir variaciones en la VFG, se observó una reducción en la excreción de creatinina en el 4º mes de tratamiento. Este dato coincidiría con observaciones de una reducción del clearance de creatinina (23), el que es atribuido más que a una alteración glomerular, a un daño y bloqueo de la luz tubular.

En resumen los resultados obtenidos demuestran que la administración crónica de aluminio por vía parenteral induce una serie de alteraciones a nivel renal que comprende a los sistemas metabólicos, la excreción de proteínas y más tardíamente la de creatinina, con cambios tubulares y sin afectar la filtración glomerular.

Tabla 3. Efecto del aluminio sobre parámetros urinarios

| | | Creatinina mg/ 24 hs | γ GT / creatinina UI/mg | Proteínas mg/24 hs |
|--------|----------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1º Mes | C n = 15 | 8.8 ± 0.4 | 1.3 ± 0.2 | 3.3 ± 0.3 |
| | T n = 17 | 9.9 ± 0.6 | 1.1 ± 0.1 | 3.7 ± 0.4 |
| 2º Mes | C n = 7 | 12.1 ± 1.1 | 1.8 ± 0.2 | 4.6 ± 0.2 |
| | T n = 10 | 11.1 ± 0.5 | 1.7 ± 0.3 | 13.7 ± 1.9 * |
| 3º Mes | C n = 8 | 13.3 ± 1.0 | 1.9 ± 0.1 | 4.8 ± 0.3 |
| | T n = 12 | 12.1 ± 0.3 | 2.2 ± 0.3 | 10.5 ± 0.6 * |
| 4º Mes | C n = 7 | 17.1 ± 1.6 | 1.7 ± 0.2 | 4.8 ± 0.4 |
| | T n = 9 | 12.6 ± 0.6* | 2.8 ± 0.2* | 14.5 ± 0.8 * |
| ANOVA | | p < 0.0000 | p < 0.0001 | p < 0.0000 |

Ratas tratadas recibieron hidróxido de aluminio (80 mg/ kg peso ip) tres veces por semana durante periodos de 1,2,3,y 4 meses. C control . T tratadas. n número de animales

Los resultados se expresan como media ± SE M

Se aplicaron ANOVA y Kruskal-Wallis con un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Las comparaciones mes a mes entre grupos control y tratado fué realizado por el test «U» de Mann Whitney.

* diferencia significativa p < 0.05 entre tratadas y controles en igual tiempo

Tabla 4. Efectos de la administración crónica de aluminio sobre la función renal

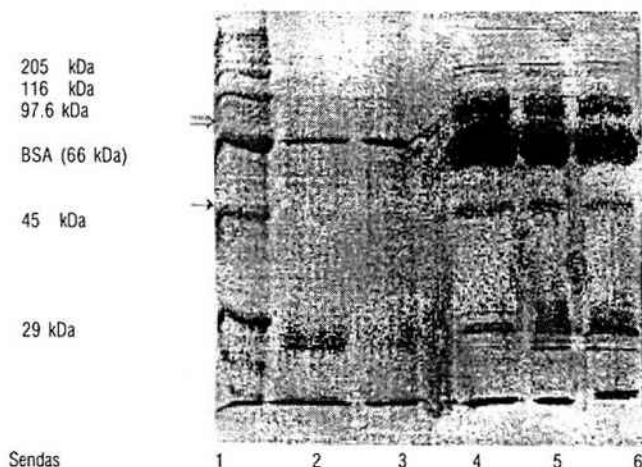
| | VFG ml/ min.100g | CI PAH ml/ min.100g | EF% H ₂ O ² | EF% Na | EF% K | FA / mg/nulina UI/ mg |
|----------|---------------------|------------------------|-----------------------------------|------------|-----------|--------------------------|
| C n = 9 | 0.89 ± 0.1 | 3.1 ± 0.5 | 1.76 ± 0.21 | 0.4 ± 0.1 | 8.8 ± 1.5 | 2.2 ± 0.6 |
| T n = 10 | 0.83 ± 0.1 | 3.4 ± 0.4 | 2.46 ± 0.25 | 0.2 ± 0.1* | 9.1 ± 1.2 | 5.1 ± 0.5* |

Ratas tratadas recibieron hidróxido de aluminio (80 mg/ kg peso ip) tres veces por semana durante 4 meses. C: control. T: tratadas. n: número de animales.

VFG: velocidad de filtrado glomerular; CI PAH: clearance de ácido paraminohipúrico; EF% H₂O: excreción fraccional de agua; EF% Na: excreción fraccional de sodio; EF% K: excreción fraccional de potasio; FA: fosfatasa alcalina.

Los resultados se expresan como media ± SE M.

* diferencia significativa p < 0.05.

Figura 2. Efecto del aluminio sobre la composición de proteínas

SDS-PAGE (10%) fue realizado en orina de 24 hs (10 mg por senda) colectada de animales controles y tratados, al 3º mes de tratamiento. 1: marcadores de PM; 2-3 orina de animales controles; 4-5-6 orina de animales tratados. (→) Proteína con movilidad relativa correspondiente a un PM aproximado de 80 kDa. (←) Proteína con movilidad relativa correspondiente a un PM aproximado entre 45-50 kDa.

Agradecimientos

Trabajo realizado con fondos 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 de Bioquímica y Cs Biológicas con el estudio estadístico

Bibliografía

- Sahin, G., Varol, I., and Temizer, A. 1994. Determination of aluminum levels in the kidney, liver and brain of mice treated with aluminum hydroxide. *Biol Trace Element Res*, 41:129-135.
- Wills, M.R., Hewitt, C.D., Sturgill, B.C., Savory, J. and Herman M.M. 1993. Long term oral and intravenous aluminum administration in rabbits. I. Renal and hepatic changes. *Ann Clin Lab. Sci*, 23:1-16
- Gómez Alonso, C., Fernández Martín, J.L., Menéndez Rodríguez, P., Fernández Soto, Y., Virgós, M.J. and Cannata, J.B. 1990. Aluminium body burden with normal renal function: risk of oral intoxication. *Nefrología*, X/4: 386-92.
- Alfrey, A.C. 1980. Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Am.J Clin Nutr*, 33:1509-1516.
- Ecelbarger, C.A., MacNeil, G.G. and Greger J.L. 1994. Importance of kidney function and duration of exposure on aluminum accumulation in mature rats. *Nutr Res* 14:577-586.
- Ecelbarger, C.A., MacNeil, G.G. and Greger, J.L. 1994. Tissue aluminum accumulation and toxic consequences in rats chronically fed aluminum with and without citrate. *J Agric Food Chem*, 42:2220-2224.
- Bertholf, R., Herman, M., Savory, J., Carpenter, R., Sturgill, C.B., Katsetos, C.D. Vandenberg, S.R., and 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
- Stein, G., Laske, V., Muller, A.; Braunlich, H.; Lin, B.W.; Fleck, G. 1987. Aluminium induced damage of the lysosomes in the liver, spleen, and kidney of rats. *J Appl Toxicol*, 7:253-258
- Roy, A.K.; Talukder, G. Sharma, A. 1991. Similar effects in vivo of two aluminum salts on the liver, kidney, bone, and brain of *rattus novergicus*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 47: 228-295

10. Mahieu, S.; Calvo M.L. 1998. Effect of chronic poisoning with aluminum on the renal handling of phosphate in the rat. *Toxicol Lett*, 94: 47-56.
11. Burnatowska-Hledin, M.A., Klein, A.M. and Mayor, G.H. 1985. Effect of aluminium on the renal handling of phosphate in the rat. *Am J Physiol*. 248: 64-69.
12. Goldstein, J.; Combes, B. 1966. Spectrophotometric assay of the liver enzyme that catalyzes sulfobromophthalein-glutathione conjugation. *J Lab Clin Med*, 67: 863-872
13. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulphhydryl. 1959. *Arch Biochem Biophys*, 82:70-73
14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-357.
15. Waugh W.H., Beall, P.T. 1974. Simplified measurement of para-aminohippuric acid and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.*, 5: 429-436
16. Roe, H.H., Epstein, J.H., Goldstein, N.P. 1949. A photometric method for determination of inulin in plasma and urine. *J Biol Chem*, 178: 839-845.
17. Stohs, S. AL-Turk, W. Angle, C. 1982. Glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in hepatic and extrahepatic tissues of female mice as a function of age. *Biochem Pharm*, 31 (11): 2113-2116.
18. Comporti M. 1987. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*, 45:143-169.
19. Jeffery, E.H., Abreo, K., Burgess, E., Cannata, J.B. and Greger, J.L. 1996. Systemic aluminium toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue and kidney. *J Toxicol Environ Health*, 48 (6): 649-65.
20. Gonzalez, M.; Contini, M. del C.; Millen, N.; Mahieu, S. 1998. Variaciones de parámetros de funcionalidad hepática por efecto del aluminio. *Fabciob*, 2: 75-82
21. Torres, A.M.; Rodriguez J.V. Elias, MM. 1989. Rat kidney function related to tissue glutathione levels. Effects of different glutathione depletors. *Comp Biochem Physiol*, 94 C: 581-587
22. Chagnac, A., Ben-Bassat, M., Weinstein T. and Levi, J. 1987. Effect of long term aluminium administration on the renal structure of the rat. *Nephron*, 47: 66-69.
23. Liu J, Nordberg G. 1995. Nephrotoxicities of aluminium and or cadmium-metallothionein in rats: creatinine excretion and metabolism of selected essential metals. *Pharmacol and Toxicol.*, 77: 155-160.