

Efectos del aluminio sobre el metabolismo del Glutacion en intestino delgado de rata

Orihuela, Daniel;* Meichtry, Verónica

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

RESUMEN: Para investigar el efecto del aluminio (Al) sobre el metabolismo intestinal del glutacion, ratas Wistar machos adultas se trataron, por sobrecarga oral, con 0, 30, 60, 120 y 200 mg de $AlCl_3$ /kg peso/día, durante 7 días. El Al produjo una disminución significativa del contenido de glutacion total y un incremento de la relación glutacion oxidado/reducido (GSSG/GSH) de la mucosa del intestino delgado, en dosis superiores a 120 mg/kg. Las actividades específicas en intestino de ciertas enzimas claves relacionadas con el glutacion, fueron alteradas por el Al. GSH-sintetasa (a partir de 60 mg/kg) y GSSG-reductasa (a partir de 120 mg/kg) estuvieron significativamente reducidas respecto del control ($P < 0,05$). Por el contrario, la actividad de γ -glutamiltanspeptidasa se incrementó por el Al. Glutacion-S-transferasa fue ligeramente modificada por el tratamiento con Al. La lipoperoxidación de la mucosa intestinal completa aumentó con la dosis de Al. Se encontró una correlación positiva en el intestino delgado entre la depleción de GSH y la reducción de la absorción de ^{45}Ca *in situ* ($r = 0,923$). Estos resultados muestran que el Al en dosis elevadas alteraría el metabolismo del GSH en el intestino delgado, contribuyendo posiblemente a la disminución de ciertas funciones absorbivas intestinales.

Palabras claves: Aluminio; Glutacion; GSSG; GSH-sintetasa; γ -glutamiltanspeptidasa.

SUMMARY: *Effects of aluminium on glutathione metabolism in small intestine of rats.* Orihuela, Daniel; Meichtry, Verónica. To study the effect of aluminium (Al) on intestinal glutathione metabolism, adult male Wistar rats were orally treated with 0, 30, 60, 120 and 200 mg of $AlCl_3$ /kg body weight/day, during 7 days. Al produced both a significant reduction of glutathione content and an increasing of oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH) ratio in the intestinal mucosae, at doses above 120 mg/kg. Specific activities of glutathione-related key enzymes were modified by Al. Both GSH-synthetase (from 60 mg/kg) and GSSG-reductase (from 120 mg/kg) were significantly reduced with respect to control ($P < 0.05$). Conversely, γ -glutamiltanspeptidase activity was increased by Al. Glutathione-S-transferase was slightly modified by Al treatment. Lipid peroxidation in the whole intestinal mucosae was increased as Al dose raised. In small intestine, a positive correlation between GSH depletion and reduction of *in situ* ^{45}Ca absorption was found ($r = 0.923$). These results show that Al, at high doses, would alter glutathione metabolism in the small intestine, contributing possibly to impair certain intestinal absorptive functions.

Keys words: Aluminium; Glutathione; GSSG; GSH-synthetase; γ -glutamiltanspeptidase.

Introducción

El aluminio (Al) es un elemento ampliamente distribuido en el medio ambiente. Es un componente de medicamentos, como antiácidos y antiulcerosos de uso oral, vendidos sin prescripción médica y que son consumidos habitualmente por la población general en cantidades elevadas. El Al presenta efectos tóxicos sobre diversos tejidos, incluidos el intestino, hueso, riñón, hígado y sistema nervioso central (1, 2), aunque algunos aspectos del mecanismo de acción sobre las células animales permanecen aún desconocidos.

El glutacion es un tripéptido sintetizado en el interior de casi todas las células animales que desempeña una gran variedad de funciones metabólicas que incluyen la detoxificación de radicales libres, metales y compuestos electrofílicos, actuando como un reductor celular (3).

El glutacion presente en el lumen intestinal proviene de la dieta, la bilis, células epiteliales descamadas y por exportación desde las células epiteliales del estómago y del intestino (4,5). La degradación del glutacion es extracelular y se lleva a cabo por la acción de la γ -glutamiltanspeptidasa (γ -GT) y la dipeptidasa, proveyendo los aminoácidos precursores que son reabsorbidos por las células epiteliales del intestino delgado. La síntesis de glutacion a partir de los aminoácidos precursores L-glutamato, L-cisteína y glicina ocurre en el citosol a

*Correspondencia a: Fax: +54-342-4575221;
e-mail: orihuela@fbcb.unl.edu.ar

través de una reacción en dos pasos catalizada por la γ -glutamylcistein-sintetasa y la glutathion-sintetasa (4,6). Más del 98% del glutathion celular se encuentra en la forma reducida. La enzima glutathion-reductasa transforma el glutathion oxidado (GSSG), generado durante el estrés oxidativo, en glutathion reducido (GSH), usando equivalentes reducidos de NADPH (7). La enzima glutathion-S-transferasa (GST) desempeña un importante papel en la detoxificación de metabolitos reactivos catalizando su conjugación con GSH (8).

Un adecuado nivel tisular de glutathion resulta esencial para el mantenimiento de la estructura y de la función de las células epiteliales del intestino (9). La depleción experimental de glutathion produce al cabo de 7 días, una sustancial disminución de la altura de la capa de células epiteliales del yeyuno y colon, marcado daño mucosal con descamación de la microvellosidad, hinchazón y degeneración mitocondrial, vacuolización del citoplasma, y cambios nucleares, observables por microscopía electrónica. La degeneración es mayor en las células del "tip", las cuales tienen un menor nivel de glutathion y un mayor nivel de γ -GT, que en las de la cripta de la vellosidad intestinal (10).

Diversas evidencias experimentales muestran que el Al puede afectar los niveles de glutathion tanto *in vivo* como *in vitro*. La administración parenteral de una dosis única de lactato de aluminio en ratones ocasionó la depleción hepática de glutathion y del citocromo P450 medidos 6 horas después de la inyección (11). La administración oral crónica durante seis semanas produjo una disminución del glutathion, de glutathion-reductasa y adenosina-trifosfatasa en homogenados de cerebro de rata (10). El sulfato de aluminio en concentraciones micromolares produjo un significativo incremento en la producción de especies reactivas al oxígeno y una significativa disminución en el contenido de glutathion en células glioma C-6 mantenidas en cultivo (12). Sin embargo, los efectos del aluminio sobre el glutathion intestinal, no han sido investigados en profundidad.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de una sobrecarga oral de Al sobre los niveles intestinales de glutathion y sobre la actividad de enzimas claves relacionadas con el metabolismo del glutathion en el intestino delgado de la rata. Se investigó la relación entre los efectos del Al sobre el glutathion y los procesos absorbivos intestinales, tomando como caso típico la absorción del calcio.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratas cepa Wistar, machos de cuatro meses de edad, con un peso corporal promedio de 285 ± 15 g, mantenidas en ambiente de temperatura controlada a 22 ± 3 °C y con un ciclo luz/oscuridad de 14 h/10 h. Se alimentaron *ad libitum* con una dieta comercial para roedores. Se ayunaron durante las 12 horas previas al sacrificio.

Protocolo experimental

Las ratas se dividieron aleatoriamente en grupos ($n=5$) y se les administró $AlCl_3$ mediante una sobrecarga oral forzada en el siguiente rango de dosis: 30, 60, 120 y 200 mg/kg peso corporal/día durante un período de 7 días. Las soluciones de Al fueron preparadas siguiendo el protocolo estandar propuesto por Tapparo y col. (13). El grupo control recibió agua bidestilada.

Al final del período experimental se les extrajo a todos los animales, bajo anestesia de éter etílico, los primeros 15 cm de intestino delgado. La mucosa intestinal se obtuvo en frío (sobre hielo seco) por raspado con portaobjetos de vidrio e inmediatamente, en las muestras homogeneizadas, se midieron los niveles de GSH y GSSG, así como las actividades específicas de las enzimas GSH-sintetasa (EC 6.3.2.3), GSSG-reductasa (EC 1.6.4.2), γ -glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2) y glutathion-S-transferasa (EC 2.5.1.18) citosólica. La peroxidación lipídica se determinó como un índice del daño oxidativo (14).

En otro grupo de animales tratados con Al de la manera antes indicada se determinó la absorción intestinal de ^{45}Ca mediante el método de los segmentos ligados *in situ*.

Determinación de GSH y GSSG

El contenido total de glutathion (GSH más GSSG) se midió en el homogenado de mucosa intestinal al 20% (p/p) con ácido 5-sulfosalicílico 5% (p/v), por el método de reciclaje de la GSSG-reductasa 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (15). El nivel de GSSG se determinó por el mismo método, tratando previamente 100 μ l del sobrenadante ácido de la muestra de mucosa intestinal con 5 μ l de 2-vinilpiridina durante 60 minutos (15). Los resultados se expresaron en μ mol/g tejido húmedo para glutathion total y como el cociente adimensional GSSG/GSH.

Enzimas intestinales

GSH-sintetasa

La actividad de GSH-sintetasa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm siguiendo la formación de ADP, usando un ensayo acoplado con piruvato-quinasa 5 U./ml y lactato-dehidrogenasa 10 U./ml, a 37 °C en buffer Tris-ClH 100 mM pH 8,2, según el método descrito por Huang y col. (16). La reacción se inició agregando 200 µl de homogenado de mucosa intestinal 10 % (p/p) en KCl 1,15 % (1 unidad enzimática equivale a 1 µmol producto / hora a 37 °C).

GSSG-reductasa

Se midió la actividad en la dirección de la reducción de GSSG a 30 °C en fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,5, a una concentración fija de NADPH 100 µM y GSSG 65 µM (aproximadamente el Km para la enzima humana) según el método descrito por Henderson y col. (17) (1 unidad de enzima reduce 1 µmol de GSSG / min a pH 7,5 a 30 °C).

γ-Glutamiltranspeptidasa

La actividad de γ-GT se ensayó en una muestra de 100 µl del homogenado de mucosa intestinal al 10 % (p/p) con KCl 1,15 %, utilizando como sustrato γ-glutamyl-p-nitroanilida 4 mM a pH 7 y a 25 °C, registrando la variación de absorbancia a 405 nm (18).

Glutation-S-transferasa

La actividad intestinal de GST citosólica se determinó de acuerdo al método descrito por Habig y col. (19). Brevemente, se homogeneizó la mucosa intestinal al 50% (p/p) en un buffer de sucrosa 0,25 M, EDTA 1 mM (pH 7,4 a 25 °C), se precipitó con CaCl₂ 8 mM y se centrifugó a 27.000 g a 4°C (20, 21). Una alícuota de 50 µl de fracción citosólica se ensayó usando como sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) 1 mM, adicionando GSH 0,5 mM a un buffer de KH₂PO₄ 0,1 M (pH 6,5 a 25 °C). La reacción se llevó a cabo en un espectrofotómetro con celda termostatzada a 25 °C, registrando la absorbancia a 340 nm. Se hicieron las correcciones para restar el componente no enzimático de la reacción (22) (1 unidad enzimática equivale a 1 µmol/min de CDNB a 25 °C, pH 6,5).

Las proteínas se midieron por el método de Gornall y col. (23) modificado, usando albúmina sérica bovina como testigo. Todas las actividades

enzimáticas se expresaron como actividades específicas en U.I por mg proteínas.

Peroxidación lipídica

La lipoperoxidación se midió en el homogenado de mucosa intestinal en KCl 1,15% en la proporción 1:10 en peso, como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) usando como testigo externo 1,1,3,3-tetrametoxipropano, de acuerdo al método de Ohkawa y col. (24). Los resultados se expresaron como nmol malondialdehído (MDA) producidos/g tejido húmedo.

Absorción de calcio

Se determinó la absorción intestinal de calcio en segmentos de duodeno-yeyuno ligados *in situ*, a una concentración de calcio total de 1 mM, usando 2 µCi/ml de [⁴⁵Ca]Cl₂ (NEN Dupont, USA) como marcador, según el método previamente descrito en detalle (25). Los resultados se calcularon en µmol calcio absorbido/10 cm, y se expresaron en porcentajes, tomando como 100 % el grupo control.

Estadística

Los resultados se presentan como promedio ± E.S. Los promedios de dos grupos se compararon por el test *t* de Student para datos agrupados. Promedios múltiples se compararon por análisis de varianza en un paso seguido del test de Newman-Keuls. El análisis de correlación lineal se realizó por el método de Pearson. El nivel de significación se fijó en 0,05 para todas las comparaciones. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con una versión registrada del programa InStat 3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

El efecto de la administración de dosis crecientes de aluminio por vía oral sobre el nivel de glutatión total de la mucosa intestinal se muestra en la figura 1. Se encontró una disminución que estuvo en relación con la dosis. La reducción se hizo estadísticamente significativa respecto del control, a partir de 60 mg/kg peso/día de AlCl₃ (1,82 vs. 2,46 µmol/g tej.húm., *P* < 0,05), llegando a una disminución del 71 % para la mayor dosis de Al ensayada. El cociente GSSG/GSH tendió a aumentar ligeramente a medida que se incrementó la dosis de Al, tornándose signifi-

cativa la diferencia para la dosis de 200 mg/kg peso/día de AlCl_3 (0,0436 vs. 0,0285, $P < 0,05$). La lipoperoxidación de la mucosa intestinal se incrementó significativamente a dosis mayores de 120 mg/kg peso/día (tabla 1).

En la figura 2 se observan las actividades específicas en intestino delgado de las enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH. Las actividades tanto de GSH-sintetasa (a partir de 60 mg/kg/día de AlCl_3) como de GSSG-reductasa (a partir de 120 mg/kg/día de AlCl_3) estuvieron significativamente reducidas respecto del control ($P < 0,05$). El aluminio

produjo un aumento estadísticamente significativo de la actividad de γ -GT a partir de la dosis de 60 mg/kg/día ($P < 0,05$). La actividad específica de GSTc mostró una tendencia a aumentar a dosis bajas, hasta 60 mg/kg/día, y a disminuir a dosis mayores de Al, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto del control sin Al.

La absorción intestinal de ^{45}Ca disminuyó a medida que aumentó la dosis de Al. En la figura 3 se muestra la correlación entre la reducción porcentual del calcio absorbido en función de la depleción porcentual del nivel de glutatión intestinal, ambos por acción del Al.

TABLA 1. Efecto del aluminio sobre la relación GSSG/GSH y la lipoperoxidación en la mucosa del intestino delgado de rata.

Dosis de Aluminio (mg AlCl_3 /kg peso/día)	GSSG/GSH	TBARS (nmol MDA/g tej.húmedo)
0	0,0285 \pm 0,0112	129 \pm 31
30	0,0288 \pm 0,0086	146 \pm 38
60	0,0294 \pm 0,0072	152 \pm 29
120	0,0358 \pm 0,0081	186 \pm 45 *
200	0,0436 \pm 0,0099 *	192 \pm 33 *

Los datos son promedio \pm E.S ($n = 5$)

* $P \leq 0,05$ comparado con el grupo control sin Al.

Figura 1: Efecto de dosis orales crecientes de aluminio sobre el nivel intestinal de GSH total.

* $P \leq 0,05$ comparado con el control sin Al.

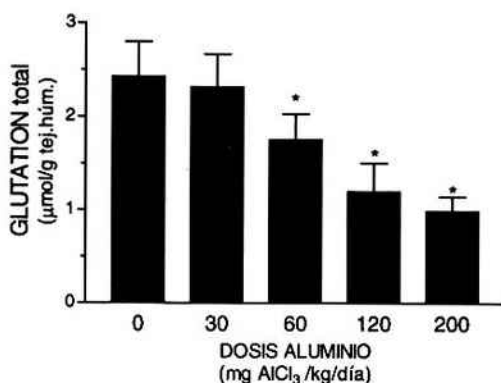


Figura 2: Actividades específicas de enzimas relacionadas con el metabolismo de GSH en intestino delgado de ratas Wistar tratadas con diferentes dosis de aluminio. *Panel A:* GSH-sintetasa. *Panel B:* γ -GT. *Panel C:* GST citosólica. *Panel D:* GSSG-reductasa.

* $P \leq 0,05$ comparado con el respectivo control sin Al

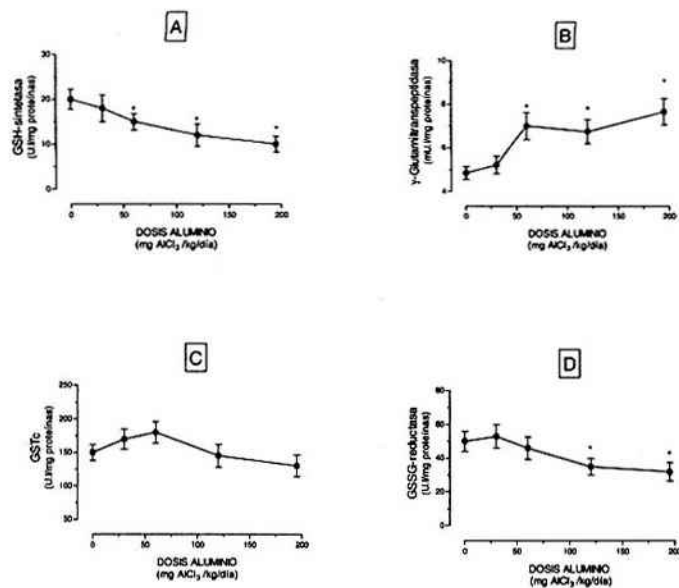
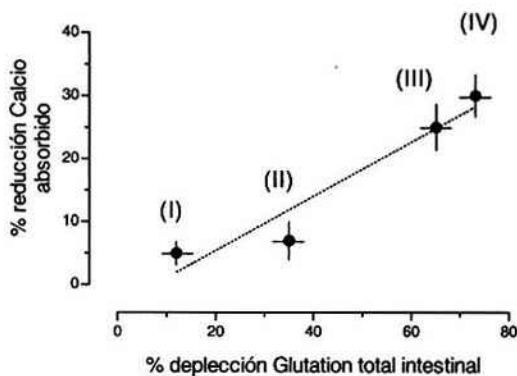


Figura 3. Correlación entre la depleción porcentual de glutatión total y el porcentaje de disminución del calcio absorbido en intestino delgado de rata, ambos por acción del aluminio. (I) 30 mg AlCl₃/kg/día; (II) 60 mg AlCl₃/kg/día; (III) 120 mg AlCl₃/kg/día; (IV) 200 mg AlCl₃/kg/día. $y = -3,207 + 0,432x$; $r = 0,923$; $P = 0,038$



Discusión

Los posibles efectos del Al sobre los principales aspectos del metabolismo intestinal del GSH fueron evaluados: síntesis (GSH-sintetasa), catabolismo (γ -GT), reacciones de conjugación (GSTc) y reacciones redox (GSSG-reductasa) (3,6,26). La disminución del GSH intestinal resultó ser dependiente de la dosis de Al, obteniéndose el menor nivel de GSH para la mayor dosis de Al ensayada. La depleción de GSH por el Al podría deberse tanto a un evento oxidativo como a una alteración de la actividad y/o inducción/represión de los genes de las enzimas claves relacionadas con el metabolismo del GSH en el intestino delgado.

De acuerdo a nuestros resultados, la causa primaria de la depleción del GSH intestinal por el Al sería la inhibición de la GSH-sintetasa, lo que llevaría a una menor velocidad de síntesis intracelular de GSH. El incremento de la actividad de γ -GT, la principal enzima ligada a membranas involucrada en la degradación del GSH (9), estaría indicando una acción del Al sobre la membrana de la microvellosidad que produciría una mayor degradación extracelular de GSH. Tomados en conjunto, estos resultados permiten plantear que el Al disminuiría el "turn-over" del GSH en las células epiteliales del intestino delgado. Para testear esta hipótesis se están planificando nuevos experimentos.

Estos efectos del Al sobre la actividad de las enzimas relacionadas con el GSH son similares a los producidos sobre otros ciclos enzimáticos. Se ha reportado que el Al puede tanto inhibir como estimular ciertas enzimas tisulares dependiendo de la dosis experimental utilizada (27-29). Zatta y col., analizando las enzimas del ciclo de Krebs en homogenados de cerebro de rata, informan que el Al produjo un aumento de la actividad de α -cetoglutarato dehidrogenasa junto a una disminución de la aconitasa (30).

El tratamiento con Al produjo una ligera alteración en la actividad de la GSTc intestinal, indicando que el metal tiene poco efecto sobre las reacciones de conjugación que involucran al GSH.

El aluminio fue capaz de producir una depleción del GSH intestinal por encima del 60% (en dosis superiores a 120 mg/kg peso/día), lo cual se sabe causa alteración en la función de las células absorbentes intestinales (5), que se manifestó en la reducción de

la capacidad de absorber calcio. Ambos fenómenos producidos por el Al, se correlacionaron positivamente. Esto podría deberse a que la reducción del nivel celular de GSH, por efecto del Al, podría tanto disminuir la disponibilidad de los grupos sulfhidrilos de ciertas proteínas involucradas en el transporte de calcio (calbindin-D, Ca-ATPasa) alterando su funcionalidad, como incrementando las especies reactivas de oxígeno ocasionando un deterioro de la absorción (31).

El cociente GSSG/GSH, comúnmente utilizado como índice de estrés oxidativo (11,32, 33), se incrementó con la dosis de Al administrada. La disminución en paralelo de la actividad de GSSG-reductasa explicaría este aumento. La producción de TBARS por la mucosa intestinal estuvo significativamente aumentada para las dosis más altas de Al. Estos resultados indican que el Al, en nuestras condiciones experimentales, produjo cambios en el status oxidativo celular del enterocito.

En resumen, se proveen evidencias que el Al, en dosis elevadas, altera el metabolismo de GSH en las células epiteliales del intestino delgado de la rata, ocasionando una disminución en los niveles intracelulares de GSH, lo cual contribuiría al deterioro de las funciones absorbentes intestinales, evidenciado por la reducción de la absorción de calcio.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con fondos de proyectos C.A.I.+D '96 (12/B138) y C.A.I.+D 2000 (20-T.I 13-programa 1), Universidad Nacional del Litoral. Agradecemos a la Dra. María Eugenia Mamprín (Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, U.N.R) por la revisión crítica del trabajo y las importantes contribuciones realizadas.

Bibliografías

- 1- Florence, A.L., Gauthier, A., Ponsar, C., Van den Bosch de Aguilar, P., Crichton, R.R. 1994. An experimental animal model of aluminum overload. *Neurodegeneration* 3, 315-323.
- 2- Goyer, R.A. 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu.Rev.Nutr.* 17, 37-50.
- 3- Wang, W., Ballatori, N. 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335-355.

- 4- Anderson, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem.Biol.Interact.* **111**, 1-14.
- 5- Meister, A. 1991. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol.Theor.* **51**, 155-194.
- 6- Anderson, M.E., Powrie, F., Puri, R.N., Meister, A. 1985. Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Arch.Biochem.Biophys.* **239**, 538-548.
- 7- Ogasawara, T., Hoensch, H., Ohnhaus, E.E. 1985. Distribution of glutathione and its related enzymes in small intestinal mucosa of rats. *Arch.Toxicol. Suppl.* **8**, 110-113.
- 8- Samiec, P.S., Dahm, L.J., Jones, D.P. 2000. Glutathione S-transferase in mucus of rat small intestine. *Toxicol Sci* **54**, 52-59.
- 9- Martensson, J., Jain, A., Meister, A. 1990. Glutathione is required for intestinal function. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**, 1715-1719.
- 10- Katyal, R., Desigan, B., Sodhi, C.P., Ojha, S. 1997. Oral aluminum administration and oxidative injury. *Biol. Trace Elem.Res.* **57**, 125-130.
- 11- Fulton, B., Jeffery, E.H. 1994. The temporal relationship between hepatic GSH loss, heme oxygenase induction, and cytochrome P450 loss following intraperitoneal aluminum administration to mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 291-297.
- 12- Campbell, A., Prasad, K.N., Bondy, S.C. 1999. Aluminum-induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma. *Free Radic.Biol.Med.* **26**, 1166-1171.
- 13- Tapparo, A., Solda, L., Bombi, G.G., Zambenedetti, P., Zatta, P.F., Bertani, R., Corain, B. 1995. Analytical validation of a general protocol for the preparation of dose-controlled solutions in aluminium toxicology. *The Analyst* **120**, 2425-2429.
- 14- Laszczycza, P., Kawka-Serwecinska, E., Witas, I., Dolezych, B., Migula, P. 1995. Iron ascorbate-stimulated lipid peroxidation in vitro. Why is the method controversial? *Gen.Physiol.Biophys.* **14**, 3-18.
- 15- Anderson, M.E. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology* **113**, 548-555.
- 16- Huang, C., He, W., Meister, A., Anderson, M.E. 1995. Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 1232-1236.
- 17- Henderson, G.B., Murgolo, N.J., Kuriyan, J., Osapay, K., Kominos, D., Berry, A., Scrutton, N.S., Hinchliffe, N.W., Perham, R.N., Cerami, A. 1991. Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**, 8769-8773.
- 18- Orłowski, M., Meister, A. 1963. g-Glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of L- and D-g-glutamyltranspeptidase activities. *Biochem. Biophys. Acta* **73**, 679-681.
- 19- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.* **249**, 7130-7139.
- 20- Cinti, D.L., Moldeus, P., Schenkman, J.B. 1972. Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca²⁺-sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 3249-3256.
- 21- Storrie, B., Madden, E.A. 1990. Isolation of subcellular organelles. *Methods in Enzymology* **182**, 203-225.
- 22- Carrillo, M.C., Kitani, K., Kanai, S., Sato, Y., Nokubo, M., Ohta, M. and 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**, 1-15.
- 23- Gornall, A.G., Bardawill, C., David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- 24- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytic. Biochem.* **95**, 351-358.
- 25- Orihuela, D. 1999. Tesis doctoral: "Diferencias ligadas al sexo en el efecto del aluminio sobre la absorción intestinal de calcio en ratas", **cap.II**, 32-34, Fac.Bioq.Cs.Biol. UNL.
- 26- Aw, T.Y., Wierzbicka, G., Jones, D.P. 1991. Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. *Chem.Biol.Interact.* **80**, 89-97.
- 27- Exley, C., Price, N.C., Birchall, J.D. 1994. Aluminum inhibition of hexokinase activity in vitro: a study in biological availability. *J.Inorg.Biochem.* **54**, 297-304.
- 28- Yoshino, M., Murakami, K., Kawano, K. 1998. Interaction of aluminum ion with ATP. Mechanism of the aluminum inhibition of glycerol kinase and its reversal by spermine. *BioMetals* **11**, 63-67.
- 29- Jovanovic MD, Ninkovic M, Malicevic Z, Mihajlovic R, Micic D, Vasiljevic I, Selakovic V, Dukic M, Jovicic A. 2000. Cytochrome C oxidase activity and total glutathione content in experimental model of intracerebral aluminum overload. *Vojnosanit Pregl* **57**, 265-270.
- 30- Zatta, P., Lain, E., Cagnolini, C. 2000. Effects of aluminum on activity of Krebs cycle enzymes and glutamate dehydro-genase in rat brain homogenate. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3049-3055.
- 31- Tolosa de Talamoni, N., Marchionatti, A., Baudino, V., Alisio, A. 1996. Glutathione plays a role in the chick intestinal calcium absorption. *Comp.Biochem.Physiol.* **115**, 127-132.
- 32- Jaeschke, H. 1990. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am.J.Physiol.* **258**, G499-G505.
- 33- Jones, D.P., Thor, H., Smith, M.T., Jewell, S.A., Orrenius, S. 1983. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca²⁺-sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J.Biol.Chem.* **258**, 6390-6393.