

# Evaluación de eventos antioxidantes en mucosa intestinal de ratas en regeneración hepática tratadas con aluminio

Contini, M.C.<sup>1</sup>; González, M.<sup>1</sup>; Mahieu S.<sup>1</sup>; Carnovale, C.<sup>2</sup>; Bernal, C.<sup>3</sup>

1. Cátedra de Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. Universidad Nacional del Litoral

2. Instituto de Fisiología Experimental. Universidad Nacional de Rosario.

3. Cátedra de Bromatología y Nutrición. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. Universidad Nacional del Litoral.

**RESUMEN:** El objeto de nuestro estudio fue analizar el efecto del tratamiento con aluminio sobre parámetros de estrés oxidativo en la mucosa intestinal de ratas en regeneración hepática (RH) a 0, 48 y 168 hs. Se midieron las concentraciones de aluminio (Al) plasmático y, en mucosa intestinal el contenido de hierro, aluminio, glutatión (GSH) y la actividad enzimática de catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). Como medida indirecta de la producción de sustancias oxígeno reactivas en mucosa intestinal se determinó el nivel de lipoperoxidación (LPO). Tanto el tratamiento con Al como la RH a las 48 hs disminuyeron las actividades de CAT y GSH-Px en mucosa intestinal que se correlacionaron con un incrementado grado de LPO. En animales Al+RH48 observamos que la actividad de CAT evidenció un efecto aditivo del tratamiento con Al y de la RH. La actividad de GSH-Px se normalizó hacia las 168hs de RH, el tratamiento con Al disminuyó su actividad a un nivel comparable a RH168 hs, el efecto Al+RH no fue aditivo ni a las 48h ni a las 168hs. En mucosa intestinal el aluminio actuaría como desencadenante de los eventos oxidativos «*per se*» en tanto que la injuria hepática lo haría de manera independiente.

**Palabras claves:** aluminio, regeneración hepática, estrés oxidativo, intestino.

**SUMMARY:** Evaluation of antioxidant events in intestinal mucose of rats in hepatic regeneration treated with aluminum (Al). Contini, M.C.; González, M.; Mahieu, S.; Carnovale, C.; Bernal, C.. The aim of our study was to investigate the effect of aluminium (Al) treatment on parameters of oxidative stress in the intestinal mucose of rats in hepatic regeneration (HR) in 0, 48 and 168 h. Plasmatic aluminium (Al) concentrations were measured as well as intestinal mucose iron, Al and glutatión (GSH) content and the enzymatic activity of catalase (CAT) and glutatión peroxidase (GSH-Px). As an indirect measurement of the production of oxygen - reactive substances in intestinal mucose the lipoperoxidation level (LPO) was determined. The Al treatment and the HR at 48 h decreased the CAT and GSH-Px activities associated with a significant increase in LPO. The CAT activity in the Al+HR48h group demonstrated an additive effect of Al and HR at 48hs. The activity of GSH-Px reached the normal level to wards 168hs post- hepatectomy, the Al treatment diminished the GSH-Px activity to a level comparable to RH168 h, the Al+HR did not have any additive effect neither at 48h nor at 168hs. In the intestinal mucose, aluminium could induce oxidative events «*per se*» whereas the hepatic regeneration might have an independent way of influencing the oxidative state.

**Keywords:** aluminum\*, hepatic regeneration\*, oxidative stress\*, gut\*.

\*Correspondencia:

Bioq. María del Carmen Contini.

Gral. López 2626. Piso 11. Santa Fe. 3000.

TE: 0342-4580244. mcontini@fbc.unl.edu.ar

## Introducción

El aluminio es considerado como un metal no esencial y el incremento de su disponibilidad biológica ha sido relacionado con el aumento de enfermedades tanto agudas como crónicas, en seres humanos. La naturaleza del aluminio forma una variedad bioquímica de complejos fuertes, por ejemplo, con grupos funcionales como fosfatos o carboxilatos. Un aspecto inusual de esta bioquímica es la actividad pro-oxidante de este metal no-redox-activo (1). El aluminio puede promover oxidación biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto ha sido demostrado al facilitar la lipoperoxidación tanto inducida como la no inducida por el hierro (2; 3; 4)

El epitelio intestinal, que incluye a los enterocitos, es cilíndrico simple. Las células aeróbicas en condiciones fisiológicas normales producen durante su metabolismo especies de oxígeno reducidas como, el anión superóxido ( $O_2^-$ ) peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilos. Estos radicales libres liberados por el oxígeno ejercen efectos tóxicos sobre los distintos sistemas biológicos del organismo.

El aumento de los oxidantes induce un incremento en la síntesis de antioxidantes endógenos como el contenido de glutatión (GSH), las actividades catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otros. El efecto neto es, por lo tanto, el mantenimiento del equilibrio homeostático en el nivel de estrés oxidativo en las células. Cuando los mecanismos de defensa son insuficientes, las sustancias oxidantes aumentan en el espacio intracelular produciendo efectos indeseables. Pueden causar entre otras, peroxidación de lípidos de membrana, inactivación de enzimas y daño en el ADN.

Estudios experimentales han demostrado claramente cómo la injuria hepática está asociada al estrés oxidativo (5). Además el nivel de estrés oxidativo (balance entre pro-oxidante y antioxidante) aumenta con la diferenciación y el envejecimiento celular. El pronóstico de fallas hepáticas severas depende de la habilidad de los hepatocitos para regenerarse (6).

La reparación del tejido hepático puede aumentar la tasa de supervivencia de pacientes que sufren falla hepática aguda y reducir el período de recuperación

luego de una resección parcial de la masa hepática (7).

El objeto de nuestro estudio fue analizar el efecto de la regeneración hepática y del tratamiento con aluminio sobre parámetros de estrés oxidativo en la mucosa intestinal de animales de experimentación.

## Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas macho, adultas, de la cepa Wistar, con un peso promedio de 330 g. Los animales fueron mantenidos en jaulas metabólicas individuales en ambiente acondicionado, con un ciclo luz-oscuridad de 12 hs /12 hs, temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C y dieta estándar "ad libitum".

Se trabajó con seis grupos experimentales correspondientes a la combinación de las variables: tratamiento con aluminio (Al) o no (C) y tiempo de regeneración hepática (RH) a las 0 hs, 48 hs y 168 hs post hepatectomía parcial (65%) habiendo elegido dichos tiempos por ser a las 48 hs un máximo de regeneración hepática y a las 168 hs el tiempo comprobado de recuperación de las funciones hepáticas (8), según la técnica de Higgins y Anderson (9). En detalle, los grupos fueron:

C+RH0: ratas controles que durante 90 días recibieron i.p. 0.5 ml de solución fisiológica como vehículo. El tiempo de RH es considerado 0 hs.

Al+RH0: ratas expuestas a una dosis de 27 mg de Al elemental/kg de peso (como hidróxido de aluminio en solución fisiológica), i.p. 3 veces por semana durante 90 días debido a que en ese período se logran concentraciones adecuadas de aluminio en tejido y sangre de acuerdo al protocolo experimental utilizado por nuestro grupo en trabajos anteriores (10)(11)(12).

C+RH48: ratas controles que fueron estudiadas 48 hs posteriores a la hepatectomía parcial.

Al+RH48: ratas expuestas al Al (como fuera indicado en Al+RH0) y analizadas 48 hs post-hepatectomía parcial.

C+RH168: ratas controles que fueron estudiadas 168 hs posteriores a la hepatectomía parcial.

Al+RH168: ratas expuestas al Al (como fuera indicado en Al+RH0) y analizadas 168 hs post-hepatectomía parcial.

Animales con 24 hs de ayuno fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), se les

extrajo sangre y luego se procedió a la extracción del duodeno y yeyuno proximal del intestino delgado, se lavó con solución fisiológica mantenida a 4°C, se seccionó el intestino longitudinalmente y se procedió al raspado y toma de la capa mucosa intestinal.

El contenido de Al en plasma y mucosa intestinal fue determinado por atomización electrotérmica (horno de grafito con plataforma L'Vov) con un espectrómetro Perkin Elmer 5000. Los resultados fueron obtenidos a partir de una curva de calibrado con estándares acuosos certificados.

Dada la correlación entre los niveles tisulares pre-existentes de hierro y los mecanismos pro/antioxidantes en los que potencialmente interviene, se evaluó el contenido de hierro en mucosa intestinal a través de una técnica de atomización por llama aire-acetileno. Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer Analyst 800 y curva de calibrado con estándares acuosos certificados. Las muestras fueron tratadas por digestión en microondas, con un digestor Milestone ETHOS 900.

Como medida indirecta de la producción de sustancias oxígeno reactivas se determinó la lipoperoxidación en mucosa intestinal, basado en la reacción de peróxidos lipídicos con ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar malondialdehído (MDA). La cantidad de productos aldehídicos generados por lipoperoxidación en la mucosa del intestino delgado fueron cuantificados por las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por el método colorimétrico de Ohkawa (13). Los resultados fueron expresados en términos de niveles malondialdehído (MDA) como nmoles por gramo de peso de mucosa intestinal, usando una curva de calibrado de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, el cual es convertido mol por mol en MDA.

Se utilizaron homogenados de mucosa intestinal en ácido tricloroacético al 5% para medir el contenido de GSH, en la forma de sulfidrilos no proteicos de acuerdo al método de Ellman (14).

Las actividades de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT) fueron medidas en la fracción citosólica de la mucosa intestinal. Para ello, se prepararon los homogenados de la mucosa intestinal utilizando un homogenizador tipo Potter. Se obtuvo el citosol a través dos centrifugaciones sucesivas con buffer sacarosa - EDTA (pH 7,4). De estos homogenados se tomó una alícuota para cada una de las distintas deter-

minaciones. La actividad enzimática catalasa (CAT) fue determinada por el método de Beers y Sizer (15), midiendo el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) cuantificando el consumo de NADPH a 340 nm, por el método de Paglia y Valentine (16).

La concentración de proteínas en la mucosa intestinal se determinó por el método de Lowry (17) expresando los resultados como mg de proteínas/g mucosa intestinal. Dichas concentraciones fueron empleadas para normalizar las expresiones de las actividades enzimáticas.

#### Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas mediante un 2 x 3 ANOVA, seguido de un test de Scheffé. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativamente diferente.

#### Resultados

Después de los 90 días de tratamiento con aluminio, el índice de mortalidad fue cero, además, no se observaron síntomas tóxicos en ninguno de los grupos experimentales utilizados. Al final de la experiencia, la media de peso corporal de las ratas tratadas con Al no tuvo diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratas no tratadas con Al ( $337 \pm 4$  g vs  $335 \pm 10$  g, respectivamente).

Los animales tratados con Al, en forma independiente del tiempo de regeneración hepática (RH), presentaron concentraciones plasmáticas de dicho elemento muy elevadas. Además, ninguna diferencia estadística se observó entre los grupos controles o tratados con Al, cuando el tiempo de RH es considerado. Los valores obtenidos (mg de Al/L plasma) fueron: Al+RH0:  $750 \pm 55^*$ ; C+RH0:  $8.5 \pm 4$ ; Al+RH48:  $820 \pm 42^*$ ; C+RH48:  $7.5 \pm 6$ ; Al+RH168:  $785 \pm 63^*$  y C+RH168:  $7.8 \pm 7$ ;  $*p < 0.05$  vs su respectivo control sin Al.

El contenido de Al y Hierro (Fe) en mucosa intestinal es mostrado en Tabla 1. Como puede observarse, los niveles de hierro no presentan diferencias por efecto del Al, ni del tiempo de RH. No obstante, los niveles de Al en mucosa intestinal fueron notoriamente influenciados por la exposición a de dicho elemento, no presentando diferencias estadísticas por efecto del tiempo de RH.

**Tabla 1:** Contenido de aluminio y de hierro en mucosa intestinal de ratas en regeneración hepática (0, 48 y 168 hs) y tratadas con aluminio. Datos expresados como la media  $\pm$  SEM (n=5 en cada grupo). Aquellos grupos que no comparten alguna letra tienen diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .

Grupos experimentales	Contenido de Al (mg Al /g de tejido)	Contenido de hierro (mg Fe /g de tejido)
C+RH0	3.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 19 <sup>a</sup>
Al+ RH0	56.8 $\pm$ 8.1 <sup>b</sup>	34 $\pm$ 16 <sup>a</sup>
C+RH48	3.2 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 16 <sup>a</sup>
Al+RH48	57.8 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	35 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
C+RH168	3.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	43 $\pm$ 15 <sup>a</sup>
Al+RH168	55.3 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 9 <sup>a</sup>

Las actividades de enzimas claves en la regulación de las defensas antioxidantes: catalasa y glutatión peroxidasa en mucosa intestinal son mostradas en la Figura 1.

El análisis de los resultados de la actividad catalasa en mucosa intestinal muestra un significativo efecto del tratamiento con Al, del tiempo de RH e interacción de las dos variables. El Al produce un significativo descenso de las actividades catalasa al tiempo 0 de RH. En los animales tratados, como en los no tratados con Al, se observó un descenso en la actividad catalasa a las 48 hs de RH, mostrando luego niveles con tendencia a incrementar o equivalentes (tratados o no con Al, respectivamente) a las 168 hs de RH. Un efecto aditivo del Al y RH fue observado en las actividades CAT a las 48 hs post-hepatectomía parcial.

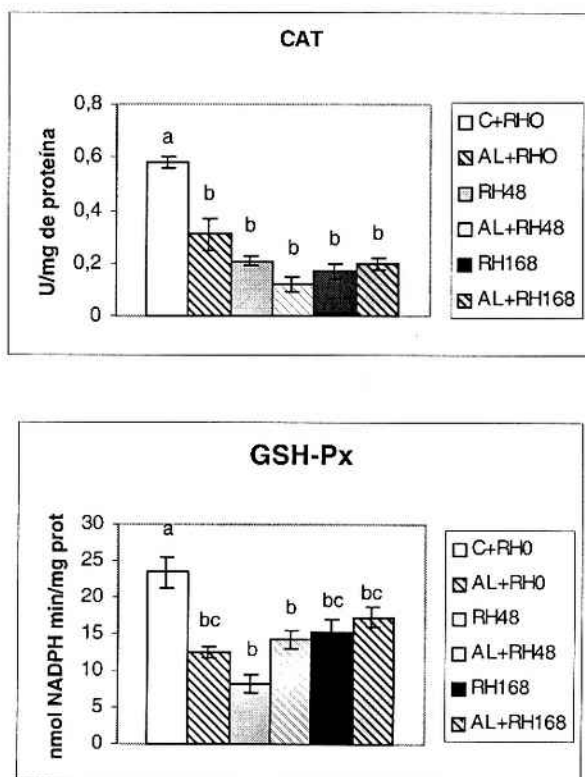
La actividad de GSH-Px se observó significativamente disminuida por el tratamiento con Al sólo al tiempo inicial de RH, luego el efecto del aluminio se enmascara cuando está presente el efec-

to de la RH. En los animales no tratados con Al la injuria de la hepatectomía disminuyó las actividades GSH-Px a las 48 hs, seguidas de un ligero aumento significativo a las 168 de RH, aunque no alcanzando los valores originales. En cambio en los animales tratados con Al, se observó que la actividad disminuida de GSH-Px tiende a recuperarse con el transcurrir del tiempo de RH, sin alcanzar los niveles de los animales C+RH0.

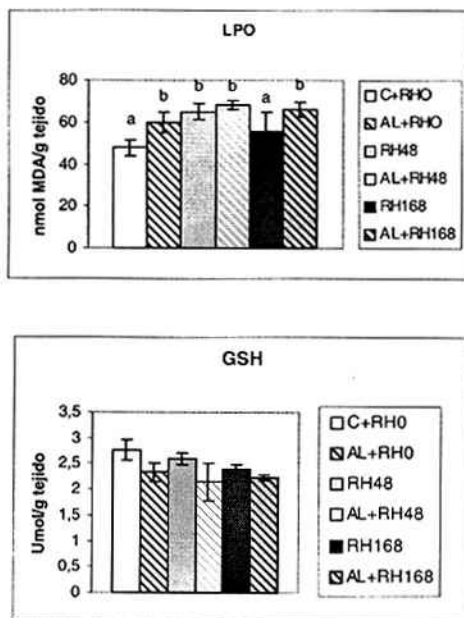
La Fig 2 muestra que los niveles de lipoperoxidación aumentaron tanto por efecto del tratamiento con Al, como también por el tiempo de RH post-injuria por hepatectomía parcial. En los animales no tratados con Al, se observó un incremento transitorio normalizándose a las 168 hs de RH; mientras que en los tratados con Al, el incremento de LPO no decreció en las 168 post-RH.

Los niveles de GSH (Fig 2) no mostraron variaciones significativas por efecto del tratamiento con Al ni por el tiempo de RH posterior a la injuria hepática.

**Figura 1:** Actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px) en mucosa intestinal de ratas en regeneración hepática (0, 48 y 168 hs) y tratadas con aluminio. Datos expresados como la media  $\pm$  SEM (n=5 en cada grupo). Aquellos grupos que no comparten alguna letra tienen diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .



**Figura 2:** Medida de la lipoperoxidación (LPO) y el contenido de glutatión (GSH) en mucosa intestinal de ratas en regeneración hepática (0, 48 y 168 hs) y tratadas con aluminio. Datos expresados como la media  $\pm$  SEM (n=5 en cada grupo). Aquellos grupos que no comparten alguna letra tienen diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .



## Discusión

La acumulación del daño oxidante por metales o por injuria produce aumento de la entropía y fatalidad de la vida aeróbica causando la muerte celular por deficiencia en los mecanismos de defensa antioxidantes (18). En términos generales, se cree que la supervivencia celular depende de las defensas antioxidantes que se encargan de la remoción de especies oxígeno tóxicas, entre los que se encuentran sistemas enzimáticos (catalasa y peroxidasa) y compuestos reductores (glutatión).

Una medida indirecta del daño oxidativo producida por compuestos oxidantes en las membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos es el índice de lipoperoxidación. La participación de las especies de oxígeno reducidas en la lipoperoxidación puede comenzar con la reducción de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . En la reducción del  $H_2O_2$  intervie-

ne el hierro ( $Fe^{2+}$  asociado a las membranas) produciendo el radical oxidrilo ( $OH\cdot$ ) (19). Esta última especie, que es deficiente de electrones, es un poderoso iniciador de reacciones por radicales libres que dispara la reacción de peroxidación de lípidos (20).

Además del  $Fe^{2+}$ , el Al podría ejercer un fuerte daño oxidativo. Acorde a nuestros resultados, el Al "per se", probablemente a través de acumulación en la mucosa intestinal, podría ejercer un marcado efecto pro-oxidante. Dicha acción se ve reflejada en la disminución de las actividades enzimáticas catalasa y glutatión peroxidasa, como así también por un incremento de los niveles de lipoperoxidación. Este mismo fenómeno ha sido reportado por otros investigadores a nivel hepático. (21;22).

Con respecto a los animales tratados con aluminio y que sufrieron además hepatectomía parcial, vemos que el patrón de comportamiento de las actividades enzimáticas catalasa y glutatión peroxidasa

refleja alteraciones de los mecanismos oxidativos con disminución de ambas enzimas cuando fueron estudiadas a las 48 hs, como a las 168 hs de regeneración hepática. En el caso de la catalasa, de acuerdo a los resultados, podríamos proponer un efecto aditivo de ambos tratamientos (Al+RH) a las 48 hs post-injuria por la hepatectomía parcial. De la misma manera la recuperación de los valores de glutatión peroxidasa a las 168 hs de regeneración hepática se podría relacionar con la disminución de los niveles de lipoperoxidación, hallazgo que no pudimos encontrar cuando los animales fueron expuestos al aluminio, ya que el metal estaría interfiriendo por sus condiciones pro-oxidantes a pesar del avanzado proceso de regeneración hepática que comenzaría a compensar los efectos deletéreos de la injuria producida.

El contenido de hierro en la mucosa intestinal no mostró variaciones en ninguno de los grupos experimentales. De los mismos podemos inferir que posiblemente no existiría relación directa entre el estrés oxidativo y los depósitos de hierro en este modelo experimental, el aluminio actuaría como desencadenante de los eventos oxidativos «*per se*» de acuerdo con los trabajos de Walling (23); Kong (24); Mendez-Alvarez (25) y Exley (26), en tanto que la injuria hepática lo haría de manera independiente concordando con los datos obtenidos por Alexandris y col. (27) quienes describen la peroxidación que se produce en el intestino después de una hepatectomía parcial.

Los aspectos discutidos en el presente trabajo podrían ser relevantes en situaciones donde se presente un perfil de injuria hepática multifactorial. Son necesarias investigaciones adicionales para clarificar los mecanismos más probables a través de los cuales el Al *per se* modificaría eventos antioxidantes en mucosa intestinal cuando injuria hepática o procesos de regeneración del hígado están presentes.

## Bibliografía

- Zatta,P; Kiss, T; Berthon, G. 2002. Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation. *Coord. Chem. Rev.* **228**:271-284.
- Gutteridge,J.M; Quinlan, G; Clark, I; Halliwell,B.1985. Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochem. Biophys. Acta* **835**: 441-447.
- Verstraeten,S. V; Oteiza, P.I. 2000. Effects of Al<sup>+3</sup> and related metals on membrane phase state and hydration: correlation with lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **375**: 340-346.
- Meglio, L; Oteiza. P.I. 1999. Aluminium enhances melanin-induced lipid peroxidation. *Neurochem. Res.* **24**: 1001-1008.
- Carnovale, C E; Scapini, ML; Alvarez, C ;Favre, J ;Monti J; and Carrillo, MC. 2000. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regenerating rat liver. *J Hepatol.* **32**(5): 798-804.
- Delany, H. M., John, J., The, E. L., Li, C. S., Gliedman, M. L., Steinberg, J.J.;Levenson, S. M. (1994). Contrasting effects of identical nutrients given parenterally or enterally after 70% hepatectomy. *Am J Surg.* **167**(1): 135-143.
- Holecck, M.1999. Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. *Nutrition.***15**(10): 784-788.
- Karran,SJ; Leach, KG; Blumgart LH. 1974. Assesment of liver regeneration in the rat using the gamma camera. *J. Nud. Med.* **15**: 10-16.
- Higgins, G. M. and 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.
- Degiorgis, N.M., Itoiz, M.E., Cabrini, R.L. 1987. Modelo experimental para el estudio de las alteraciones óseas producidas por el aluminio. *Actas II Congreso osteología y metabolismo mineral. Argentina.* **19**.
- Calvo,ML; Mahieu, S; Millen,N; González,MA; Contini, MC. 1998. Evaluation of biochemical parameters in aluminumized rats. *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana.* **48**: 32-40.
- Mahieu,S; Contini,MC; Millen,N; Gonzalez, M; Elias,MM. 2000. Aluminum toxicity. Hematological effects. **111**:235-242.
- Ohkawa, H; Ohishi, N; and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358
- Ellman GI. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Archs. Biochem. Biophys.* **82**: 70-73.
- Beers, R.F and Sizer, I.W.1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**:133-140.
- Paglia, D.E and Valentine W.N. 1967.Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**: 158-169.
- Lowry, O. H. Rosobrough, N. J., Farr, A. L. Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **193**: 265- 275.
- Sohal, RS; and Allen, RG.1990. Experimental Gerontology. **25**: 499.

19. Exley, C. A biogeochemical cycle for aluminium? . 2003. *J. Inorg. Biochem.* **97**: 1-7.
20. Girotti, A. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**: 1529 - 1542.
21. Chainy G. B.N.; Samanta, L.; Rout, N.B. 1996. Effect of aluminum on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation of rat liver. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **94**: 217-220.
22. Abubakar, M.G.; Taylor, A.; Ferns A.A. 2003. Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. *Int. J. Exp. Path.* **84**: 49-54.
23. Walling, M.W.; Kimber, D.V. 1975. Calcium absorption by intestine. Stimulation in vitamin D-deficient nephrectomized rats by *Solanum glaucophyllum*. *Gastroenterology.* **69**(1): 200-5.
24. Kong, S.; Liochev, S.; Fridovich, I. ( 1992). Aluminum (III) facilitates the oxidation of NADH to the superoxide anion. *Free Radic Biol Med.* **13**(1):79-81.
25. Mendez-Alvarez, E.; Soto-Otero, R.; Hermida-Ameijeiras, A.; Lopez-Real, A. M.; Labandeira-Garcia, J.L. 2002. Effects of aluminum and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autooxidation: relevance for pathogenesis of Parkinson's disease. *Biocim. Biophys. Acta.* **1586**: 155-168.
26. Exley, C. 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free radical Biology and Medicine.* **36** (3): 380-387.
27. Alexandris, I.H., Assimakopoulos, S.F., Vagianos, C.E., Patsoukis, N., Georgiou, C., Nikolopoulou, V., and Scopa, C.D. 2004. Oxidative state in intestine and liver after partial hepatectomy in rats. Effect of bombesin and neurotensin. *Clin Biochem.* **37**(5): 350-356.