

# Efectos de dos especies de aluminio (Al) sobre distintos sistemas fisiológicos en la rata

Gaydou, L.<sup>1,2</sup>; Mahieu, S.T.<sup>1</sup>; Fernández de Carrera, E.T.<sup>2</sup>

1- Cátedra de Fisiología Humana. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Ciudad Universitaria. Paraje el Pozo.

2- Cátedra de Matemática, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Ciudad Universitaria. Paraje el Pozo.

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos toxicológicos de dos especies químicas de aluminio (Al), una orgánica, lactato de Al ( $\text{Lac}_3\text{Al}$ ) y otra inorgánica, hidróxido de Al  $[(\text{OH})_3\text{Al}]$ , sobre algunos sistemas biológicos durante una intoxicación crónica, y comparar los resultados utilizando distintos métodos estadísticos. Se determinaron parámetros hematológicos, de funcionalidad renal y de oxidación tisular en tejido hepático y renal. Ambos compuestos afectaron los parámetros antes mencionados, encontrándose diferencias a nivel hematológico en la concentración de glóbulos rojos, VCM y HCM, más afectados con  $\text{Lac}_3\text{Al}$ . A nivel renal, se observaron alteraciones en la capacidad de concentrar la orina y en el balance de sodio, ambos más disminuidos con  $\text{Lac}_3\text{Al}$ . Tanto en hígado como riñón se observó un incremento del estrés oxidativo con ambos compuestos, aunque fueron más significativos en riñón con  $\text{Lac}_3\text{Al}$ , coincidiendo esto con la mayor acumulación de Al en este órgano. Los datos indicarían que el  $\text{Lac}_3\text{Al}$ , por ser más estable y soluble, puede inducir mayores efectos sobre distintos sistemas fisiológicos.

**Palabras clave:** especiación del aluminio, parámetros hematológicos, hígado, riñón.

**SUMMARY:** Effects of two aluminum (Al) species on different physiological systems in rat. Gaydou, L.; Mahieu, S. T.; Fernández de Carrera, E.T. The goal of this work was to study the toxic effects of two aluminum (Al) chemical species, one organic, Al lactate ( $\text{Lac}_3\text{Al}$ ), and the other inorganic Al hydroxide  $[(\text{OH})_3\text{Al}]$ , on biological systems during chronic intoxication, and compare the results by using different statistical methods. Hematological parameters were determined, as well as those of renal function and hepatic and renal oxidation. Both compounds affected the mentioned parameters, with differences in hematological levels, such as red blood cell concentration, MCV and CMH, which were more affected by  $\text{Lac}_3\text{Al}$ . In renal tissue, alterations were observed linked to urine concentration capacity and sodium balance, both more diminished with  $\text{Lac}_3\text{Al}$ . In liver and kidney, an increase of the oxidative stress was observed with both compounds, although it was more significant in kidney with  $\text{Lac}_3\text{Al}$ , coinciding this with a larger Al accumulation in this organ. The data might indicate that  $\text{Lac}_3\text{Al}$ , due to its stability and solubility, could induce bigger effects on different physiological systems.

**Key words:** aluminum speciation, hematological parameters, liver, kidney.

---

**Correspondencia:**

luisa\_gaydou@hotmail.com

Recibido: 9-06-05

Aceptado: 8-09-05

## Introducción

Se sabe que el Al se acumula en distintos tejidos (riñón, hígado, hueso, cerebro), produciendo alteraciones funcionales, y afectando al tejido hematopoyético. Sin embargo, no existe suficiente información que relacione la especiación del Al con su toxicidad. Hay una amplia variación en la habilidad que poseen distintos ligandos para solubilizar y transportar al Al a sus blancos de acción, de ahí que algunos complejos sean más tóxicos que otros. Estos compuestos serían aquellos que produjeran una mayor concentración de Al libre en solución, aumentando su biodisponibilidad (1). Sin embargo, ésta va a estar condicionada por el pH de la solución (1, 2, 3).

En pacientes dializados que presentan insuficiencia renal crónica, el Al causa encefalopatía, osteomalacia y anemia normocrómica. Un menor número de pacientes evidencia anemia microcítica hipocrómica. Este tipo de anemia se puede revertir suspendiendo la exposición al Al, o eliminándolo en forma de complejo, lo que sugiere el rol tóxico del Al (4). También se observaron efectos similares en pacientes sin insuficiencia renal crónica. Este hecho fue comprobado además mediante la administración de Al a animales de experimentación sin alteraciones renales, observándose que, cualquiera fuera el complejo de Al o la vía de administración, se desarrollaba anemia (5).

El Al se excreta principalmente por orina, a través de distintos mecanismos: filtración glomerular, reabsorción tubular del Al filtrado y excreción en túbulos distales. El acumulo de Al en riñón induce daños en células de los túbulos renales, lo que ocasionaría nefrotoxicidad. Asimismo, se demostró la existencia de alteraciones tubulares renales, evidenciados por una menor capacidad de concentrar la orina, así como modificaciones en excreciones de agua e iones (6).

El Al podría promover la oxidación biológica ya sea facilitando la peroxidación lipídica inducida por el Fe (II) sobre membranas y liposomas, o a través de la formación de un radical de superóxido de Al semirreducido (5, 7).

Al comparar observaciones de una misma variable obtenidas en distintos tiempos sobre un mismo individuo, conocidas como medidas repetidas

(MR) o datos longitudinales, se utilizan métodos estadísticos especiales, dado que dichas observaciones no son independientes. Existen métodos específicos para solucionar problemas de MR. Uno, el denominado de *datos agrupados*, con un diseño jerárquico de niveles (8), otro, con *modelos lineales mixtos* (9), más recientemente, otro modelo donde cada valor de la variable dependiente es calculado mediante una regresión de las variables de interés (10), y por último los modelos de ANOVA con MR, que se utilizan para estudiar el efecto de uno o más factores cuando al menos uno es un factor intra-sujetos. Sus ventajas: requieren menos sujetos que un diseño completamente aleatorizado, y permiten eliminar la variación residual, porque son los mismos individuos (11).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto toxicológico de dos compuestos de Al, uno orgánico y otro inorgánico, sobre el sistema eritropoyético periférico, algunas funciones renales y sistemas de oxidación tisular hepático y renal, aplicando los métodos estadísticos apropiados a variables continuadas en el tiempo.

## Materiales y métodos

### Preparación de soluciones

Se utilizaron dos compuestos de Al: uno orgánico, el lactato de Al ( $\text{Lac}_3\text{Al}$ ) y uno inorgánico, el hidróxido de Al [ $(\text{OH})_3\text{Al}$ ]. Se prepararon soluciones de concentración nominal de 43,2g/L y 128,6g/L respectivamente, correspondiendo a una concentración final de Al libre, a pH 7, de 3,97g/L en ambos grupos. En la preparación de las mismas se siguió el protocolo propuesto por Zatta y col (2).

### Animales y tratamiento

Se trabajó con ratas macho Wistar, peso promedio de 265g, distribuidos en dos grupos: un grupo Lac ( $n=13$ ), y un grupo  $\text{Al}_2$  ( $n=13$ ). Ambos fueron subdivididos en 2 subgrupos: uno tratado (Lac y  $\text{Al}_2$ ) y otro control ( $C_1$  y  $C_2$ , respectivamente). Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de  $\text{Lac}_3\text{Al}$ , y al  $\text{Al}_2$  0,5ml de la solución de  $(\text{OH})_3\text{Al}$ . A  $C_1$  se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo  $C_2$  solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana

durante 3 meses, y se les suministró agua y comida ad libitum, manteniéndolas en ciclo luz – oscuridad (12:12 horas).

Se les realizó los estudios siguientes.

#### **Estudios metabólicos**

Al cabo del primer, segundo y tercer mes se realizaron estudios de balances de agua y sodio (Na), y excreción de potasio (K) por orina.

#### **Función renal**

Al completar el 1º, 2º y 3º mes, se midió la capacidad de concentrar la orina. Para esto, se mantuvieron las ratas por 24hs sin acceso a comida ni agua, y luego se colectó la orina en un período de 4hs, y se les extrajo sangre de cola. Se cuantificó la osmolaridad y volumen urinario. En orina se determinó además la excreción de proteínas y fosfatasa alcalina (ALP). En el suero se determinó la osmolaridad a fin de obtener la relación osmolaridad orina – plasma (U/P), y se dosó uremia. Al completar el 3º mes se extrajo sangre por punción cardíaca y se determinó la concentración de aldosterona (Ald), Al, Na y K.

#### **Estudios hematológicos**

Al cabo del 1º, 2º y 3º mes, se les extrajo sangre de cola para la obtención de parámetros hematológicos, que fueron determinados con contador hematológico (Cell Dyn 3500), y Fe sérico. Se realizaron extendidos de sangre, los que fueron coloreados con colorante Nazim.

#### **Estudios bioquímicos en tejidos**

Al cabo del tercer mes, se sacrificaron las ratas y se les extrajo el hígado y los riñones, que se utilizaron para la determinación de glutatión (GSH), grado de lipoperoxidación (LPO) y concentración de Al. Se determinó GSH en homogenados de preparados con TCA frío al 5% en HCl 0,01M, método descrito por Ellman (12). La LPO se determinó en homogenados preparados con KCl 1,15%, de acuerdo con el método de Okhawa (13).

#### **Métodos analíticos**

El Na y el K en suero y orina se midieron por fotometría de llama. La osmolaridad se determinó

con osmómetro Vapro 5520 de WESCOR. La proteinuria se cuantificó con reactivo de Extón (14). La Ald se midió por radioinmunoanálisis (RIA DPC). ALP, urea y Fe fueron medidos por tests comerciales de acuerdo con las indicaciones del productor (Laboratorio Wiener, Rosario). Las determinaciones de Al se realizaron por atomización electrotérmica en condiciones STPF y por atomización por llama, empleando el método de curva de calibrado con estándares acuosos certificados y utilizando un espectrómetro PERKIN ELMER AANALYST 800.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con el programa SPSS 10.0 (Statistical Package for Social Sciences, 1995), utilizando análisis de medidas repetidas (ANOVA de MR) para comparar los grupos en el período de los tres meses. En aquellos casos donde no se pudo aplicar este método, por efecto de la interacción entre individuos, se realizaron las comparaciones utilizando el test de Mann-Whitney en cada punto del tiempo seleccionado.

En ambos modelos se utilizaron dos niveles de confianza:  $\alpha = 0,05$  y  $\alpha = 0,1$ , anotando las diferencias cuando los P obtenidos eran menores que los  $\alpha$  seleccionados.

#### **Resultados**

No se observaron signos clínicos en los animales tratados. En Lac se observó una concentración de Al plasmática de  $1200 \pm 34 \mu\text{g/L}$  y en Al<sub>2</sub> de  $210 \pm 25 \mu\text{g/L}$  en comparación con los valores de C<sub>1</sub> ( $7,9 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$ ) y C<sub>2</sub> ( $5,5 \pm 1,1 \mu\text{g/L}$ ) respectivamente. Además, la concentración hepática de Al en Lac fue de  $145 \pm 12,1 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo y de  $158 \pm 13,5 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo en Al<sub>2</sub>, y en riñón fue de  $27 \pm 2,5 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo en Lac y  $10 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo en Al<sub>2</sub>, existiendo diferencias significativas entre tratamientos en este último. Las concentraciones en los tejidos hepático y renal de los animales controles fueron respectivamente  $7,5 \pm 0,7$  y  $3,3 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo respectivamente.

Luego de tres meses de tratamiento, se observó una disminución de peso corporal en Al<sub>2</sub> respecto a sus controles del 16%, mientras que en Lac se observó una reducción sostenida que en el 3º mes

alcanzó al 23% respecto de sus controles. Esta disminución de peso se debió por lo menos en parte a una menor ingesta de alimento, que al 3º mes fue un 12% menor en  $Al_2$  que  $C_2$  y un 14% menor en Lac que en  $C_1$ .

Con las dos especies utilizadas no se observaron variaciones en el balance de agua en los meses estudiados. Sin embargo, se pudo evidenciar un aumento de la diuresis en los tres meses con  $(OH)_3Al$ , mientras que en las ratas tratadas con  $Lac_3Al$  este efecto se observó sólo al 2º mes. Simultáneamente, se comprobó una reducción de la osmolaridad urinaria durante todo el tratamiento con  $(OH)_3Al$  y en Lac sólo en los dos primeros meses, existiendo diferencias entre tratamientos al 1º mes (tabla 1).

El balance de Na se encontró disminuido en los tres meses en ambos grupos debido a una menor ingesta y mayor excreción de Na a lo largo del tiempo. Comparando el efecto de ambos compuestos, el balance de Na fue menor en Lac que en  $Al_2$  en el 2º y 3º mes, y mientras que en Lac fue disminuyendo con el tiempo, en  $Al_2$  tendió a restablecerse, coincidiendo con la menor excreción de Na urinario (figura 1). Esto fue acompañado de un aumento al 3º mes en los niveles de Ald, que en Lac fue de un 129% y en  $Al_2$  fue de 123% respecto de sus controles, sin encontrarse cambios en la concentración plasmática de Na y K. No se observaron diferencias en las concentraciones de urea plasmática al 3º mes en ambos grupos, así como tampoco aumentos en la proteinuria.

Si se evidenció un incremento en ambos grupos en la excreción de ALP, expresada como mUI de ALP / mg de creatinina, a partir del 1º mes, siendo los datos al tercer mes: Lac  $233,88 \pm 33,65^*$ ;  $C_1$ :  $134,48 \pm 21,77$ ;  $Al_2$   $237,84 \pm 13,5^*$ ;  $C_2$ :  $137,51 \pm 30,80$  (\* $P < 0,05$ ), no existiendo diferencias entre ambos tratamientos.

Las pruebas de concentración de orina mostraron un incremento de la diuresis durante todo el tratamiento en  $Al_2$  y sólo al tercer mes con Lac. En cuanto a la osmolaridad urinaria, en  $Al_2$  se observó una disminución significativa sólo al 1º mes, mientras que en Lac la reducción se comprobó en el 2º y 3º mes con respecto a sus controles, siendo siempre menores los valores en Lac (tabla 2). No se observaron diferencias en la osmolaridad sérica.

Considerando los parámetros hematológicos, se observó un aumento en la concentración de GR en ambos grupos a partir del 1º mes, siendo más notorio el incremento producido en Lac (figura 2). El hematocrito (Hto) mostró una reducción sostenida en este mismo grupo, mientras que en  $Al_2$  sólo descendió al segundo mes, para aumentar luego en el tercero (tabla 3). Ambos tratamientos redujeron tanto la hemoglobina corpuscular media (HCM) como el volumen corpuscular medio (VCM), siendo el efecto más pronunciado en Lac (figura 2). El RDW (ancho de distribución de los GR) se encontró aumentado constantemente en ambos grupos tratados, siendo mayor en Lac en el primer mes, iguales en el segundo y mayor en  $Al_2$  en el tercer mes (tabla 3). Esto se corroboró en los extendidos por microscopía óptica, donde fue posible observar poiquilocitosis y anisocitosis (alteración en la forma y tamaño, respectivamente) (figura 3).

En estudios bioquímicos en homogenados a nivel hepático se observó una disminución de GSH con aumento en los valores de LPO, sin mostrar variaciones entre los tratamientos. Por otra parte, en riñón ambos grupos produjeron una disminución de GSH con aumentos de LPO, siendo el efecto más pronunciado con  $Lac_3Al$  (figura 4).

## Discusión y conclusión

Las diferentes especies de Al, orgánicas e inorgánicas, pueden producir alteraciones fisiológicas variadas y de distinta magnitud, ya que la especiación química estaría condicionando tanto su biodisponibilidad como su posible mecanismo de acción (15)

En este trabajo se estudió la posibilidad del Al de inducir efectos tóxicos a través de su acumulación crónica. Conociendo que los efectos biológicos observados dependen de la estabilidad hidrolítica y de su comportamiento hidrofílico o hidrofóbico, se decidió comparar los efectos de dos compuestos de Al: uno con baja solubilidad y alta capacidad hidrolítica  $(OH)_3Al$  y el otro altamente soluble en agua y relativamente estable a pH neutro  $Al(Lac)_3$ .

A pesar de utilizar similares concentraciones efectivas reales de Al con los dos compuestos estudiados, las concentraciones plasmáticas alcanza-

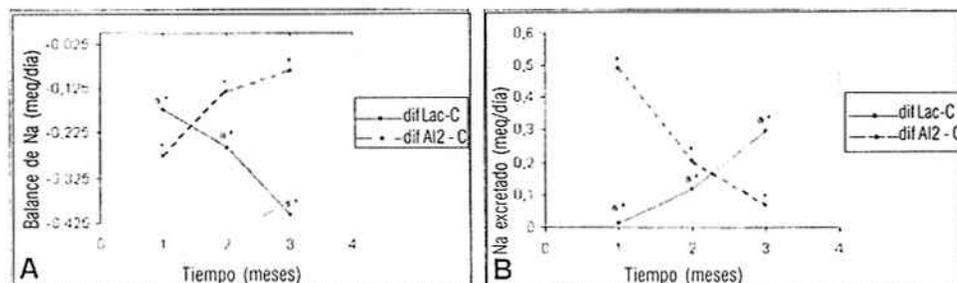
**Tabla 1:** Diuresis, osmolaridad urinaria y balances de agua al final del 1º, 2º y 3º mes de tratamiento en ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac Al, y al Al 0,5ml de la solución de (OH) Al. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (DS).

Parámetros	mes	Lac Al <sub>3</sub>		(OH) Al <sub>3</sub>	
		control	tratados	control	tratados
Diuresis (ml)	1	9,25 $\pm$ 2,47	9,01 $\pm$ 2,32	7,53 $\pm$ 1,31	10,68 $\pm$ 0,99*
	2	7,16 $\pm$ 1,05	9,88 $\pm$ 1,74*	7,62 $\pm$ 0,50	10,38 $\pm$ 1,50*
	3	11,75 $\pm$ 1,09	8,55 $\pm$ 2,18	7,48 $\pm$ 0,64	10,56 $\pm$ 2,61*
Osmolaridad (mOsm/kg)	1	2500 $\pm$ 316	1400 $\pm$ 277 *	2324 $\pm$ 171	1817 $\pm$ 173*
	2	2029 $\pm$ 244	1678 $\pm$ 226*	2061 $\pm$ 90	1574 $\pm$ 148*
	3	2249 $\pm$ 192	2193 $\pm$ 270	2278 $\pm$ 228	1696 $\pm$ 256 *
Balance de agua (ml/día)	1	12,21 $\pm$ 2,60	6,29 $\pm$ 2,04	13,67 $\pm$ 1,82	10,40 $\pm$ 3,47
	2	13,04 $\pm$ 2,53	10,09 $\pm$ 1,26	8,63 $\pm$ 0,51	12,43 $\pm$ 2,45
	3	10,38 $\pm$ 1,81	17,03 $\pm$ 5,60	9,32 $\pm$ 1,33	11,56 $\pm$ 1,71

\* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,041$ .

Δ Diferencias significativas entre tratamientos al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,015$ .

**Figura 1.** Diferencias en **A)** Balance y **B)** excreción de Na al final del 1º, 2º y 3º mes de tratamiento entre ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac Al, y al Al 0,5ml de la solución de (OH) Al. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. \* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,030$ . Diferencias significativas entre tratamientos al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,001$ .



**Tabla 2.** Pruebas de concentración de orina al final del 1º, 2º y 3º mes de tratamiento en ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac AI, y al AI 0,5ml de la solución de (OH) AI. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C, solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. Los valores de volumen minuto y osmolaridad urinaria son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (DS).

Parámetros	mes	Lac AI <sub>3</sub>		(OH) AI <sub>3</sub>	
		control	tratados	control	tratados
Volumen minuto ( $\mu$ l/min)	1	1,15 $\pm$ 0,33	1,65 $\pm$ 0,51	2,16 $\pm$ 0,91	5,52 $\pm$ 2,15 *
	2	2,77 $\pm$ 0,59	3,07 $\pm$ 0,63	2,60 $\pm$ 0,92	3,55 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>
	3	3,31 $\pm$ 0,28	5,92 $\pm$ 2,59*	4,29 $\pm$ 1,49	5,65 $\pm$ 1,08
Osmolaridad orina concentrada (mOsm/kg)	1	2424 $\pm$ 534	2569 $\pm$ 557	2884 $\pm$ 220	2478 $\pm$ 353*
	2	2276 $\pm$ 182	1874 $\pm$ 189 <sub>a</sub> *	2333 $\pm$ 178	2407 $\pm$ 334
	3	2484 $\pm$ 119	1862 $\pm$ 158 <sub>a</sub> *	2356 $\pm$ 145	2481 $\pm$ 263

\* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,045$ . <sup>a</sup> Diferencias significativas entre tratamientos al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,014$ .

**Tabla 3.** Parámetros hematológicos al final del 1º, 2º y 3º mes de tratamiento en ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac AI, y al AI 0,5ml de la solución de (OH) AI. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C, solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. Los valores de Hb, Hto, CHCM, RDW y Fe sérico son expresados como la media  $\pm$  DS

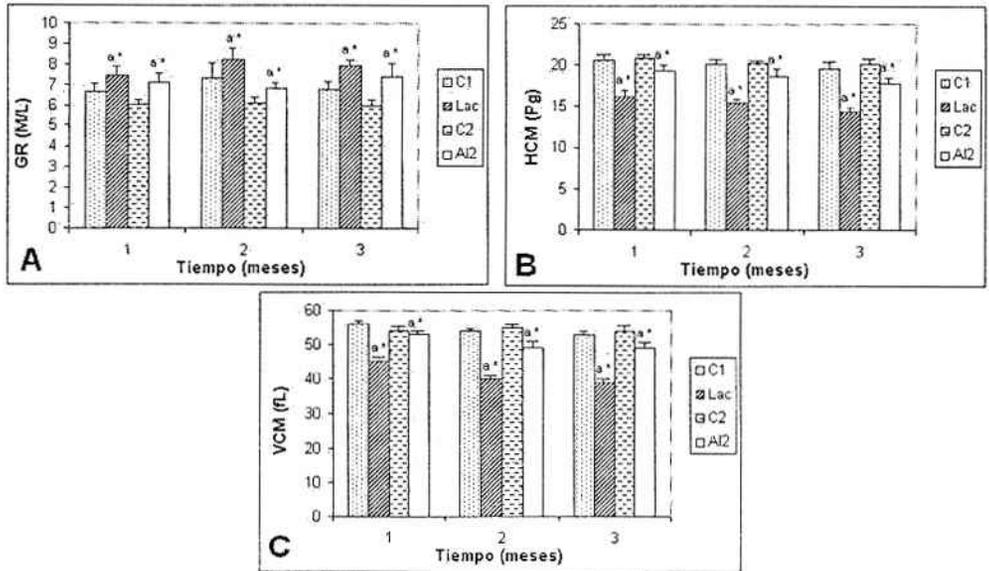
Parámetros	mes	Lac AI <sub>3</sub>		(OH) AI <sub>3</sub>	
		control	tratados	control	tratados
Hb (g/dL)	1	13,7 $\pm$ 0,8	11,9 $\pm$ 0,6 <sub>a</sub> *	13,2 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6
	2	14,7 $\pm$ 1,3	12,7 $\pm$ 1,0 <sub>a</sub> *	13,1 $\pm$ 0,8	12,6 $\pm$ 0,6
	3	13,8 $\pm$ 0,5	10,9 $\pm$ 0,7 <sub>a</sub> *	13,1 $\pm$ 1,2	13,1 $\pm$ 0,9
Hto (%)	1	36,7 $\pm$ 1,7	33,2 $\pm$ 1,7 <sub>a</sub> *	35,2 $\pm$ 1,8	37,5 $\pm$ 2,2
	2	39,6 $\pm$ 3,4	33,3 $\pm$ 2,6 <sub>a</sub> *	35,2 $\pm$ 1,9	33,4 $\pm$ 1,6**
	3	37,1 $\pm$ 2,1	31,3 $\pm$ 1,7 <sub>a</sub> *	35,7 $\pm$ 3,6	36,1 $\pm$ 2,7
RDW	1	14,0 $\pm$ 1,0	17,1 $\pm$ 0,5 <sub>a</sub> *	13,9 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,7*
	2	15,6 $\pm$ 0,5	16,1 $\pm$ 0,6 *	15,6 $\pm$ 0,5	16,4 $\pm$ 0,9*
	3	15,5 $\pm$ 1,0	15,7 $\pm$ 0,5 <sub>b</sub> *	14,7 $\pm$ 0,6	16,8 $\pm$ 1,0*
Fe ( $\mu$ g/dL)	1	239 $\pm$ 44	236 $\pm$ 78 <sub>a</sub>	188 $\pm$ 27	199 $\pm$ 31
	2	166 $\pm$ 24	200 $\pm$ 51 <sub>a</sub>	261 $\pm$ 66	199 $\pm$ 65*
	3	212 $\pm$ 42	244 $\pm$ 73 <sub>a</sub>	219 $\pm$ 66	145 $\pm$ 25*

\* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,008$ . \*\* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 1%. En todos los casos  $P < 0,093$ .

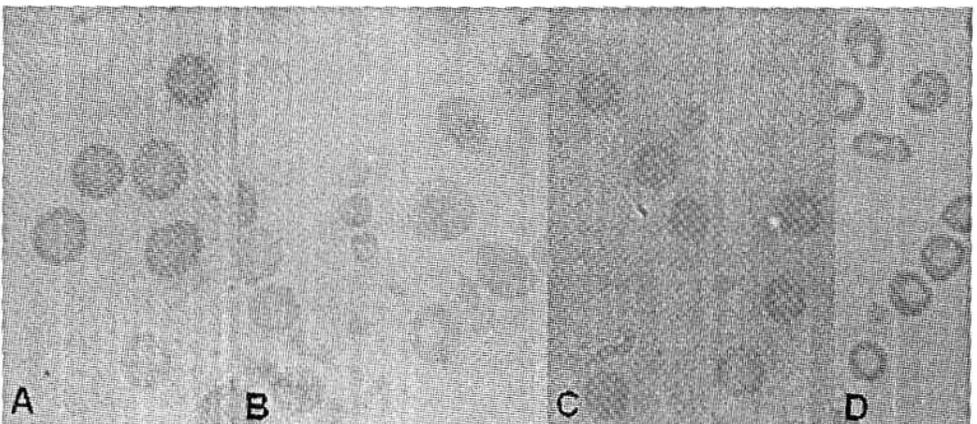
<sup>a</sup> Diferencias significativas entre tratamientos al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,012$ .

<sup>b</sup> Diferencias significativas entre tratamientos al 1%. En todos los casos  $P < 0,072$ .

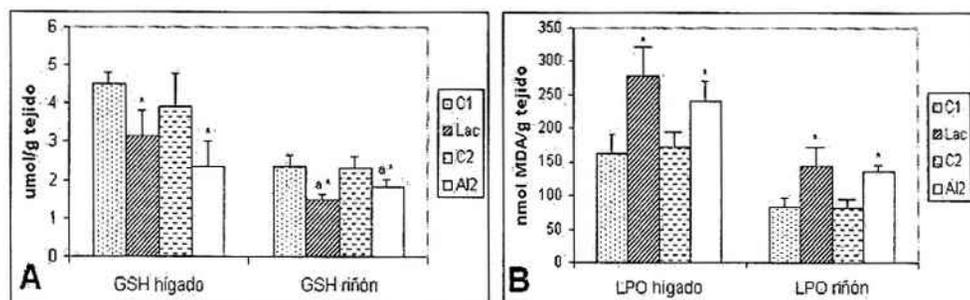
**Figura 2.** Efectos de los distintos compuestos de Al sobre la concentración de A) GR, B) HCM y C) VCM al final del 1º, 2º y 3º mes de tratamiento en ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac Al, y al Al 0,5ml de la solución de (OH) Al. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. Los valores son expresados como la media  $\pm$  DS. \* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,035$ . Diferencias significativas entre tratamientos al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,002$ .



**Figura 3.** Extendidos sanguíneos al final del 3º mes de tratamiento en ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac Al, y al Al 0,5ml de la solución de (OH) Al. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. A) C1 B) Lac C) C2 D) Al.



**Figura 4.** Valores de A) GSH y B) LPO en hígado y riñón al 3<sup>o</sup> mes de tratamiento entre ratas control y tratadas. Al grupo Lac se les inyectó 0,5ml de la solución de Lac Al, y al Al<sub>2</sub> 0,5ml de la solución de (OH) Al. A C se le administró lactato de Na, para obtener una concentración de lactato igual que las Lac, y al grupo C<sub>2</sub> solución fisiológica. Todos los grupos fueron inyectados por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante 3 meses. Los valores son expresados como la media  $\pm$  DS. \* Diferencias significativas entre tratadas y su control al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,016$ . Diferencias significativas entre tratamientos al 0,5%. En todos los casos  $P < 0,041$ .



das, así como la acumulación renal fueron superiores en Lac. Esto estaría dependiendo de la mayor solubilidad y estabilidad del compuesto. Por otra parte el Al ultrafiltrable es en parte reabsorbido a nivel del túbulo proximal, efecto que se vería favorecido bajo la forma de lactato ya que existen datos que indican cambios en el manejo tubular de Al con la especiación (16, 17).

No obstante, la acumulación hepática es similar con ambos compuestos. Es conocido, que independientemente de la especie utilizada, la transferrina (Tf) constituye el principal vehículo del Al en sangre y aparentemente este complejo (Tf-Al) podría ser reconocido por el receptor específico para Tf presente a nivel de la membrana del hepatocito facilitando el ingreso del catión (5), lo que podría determinar los niveles de Al observados.

Con ambas especies comprobamos cambios en la función renal en ratas luego de la exposición prolongada, pero sin una marcada falla renal global tal como lo muestra la ausencia de variaciones en la uremia. Sin embargo, pudimos determinar alteraciones renales usando estudios de balances de agua y Na, y pruebas de concentración de orina, sin cambios en las concentraciones plasmáticas de Na y K, pero con un incremento en la concentración de Ald. Por otra parte el aumento en la actividad de ALP

urinaria observada, podría ser indicativa de una pérdida de membranas apicales de células tubulares proximales (6). Estas fallas observadas tanto en condiciones de hidratación como deshidratación sugieren que algunos sistemas de transporte a nivel tubular podrían estar afectados por el Al.

No solo la capacidad de los compuestos para afectar las funciones tubulares renales es distinta sino que además presentan diferencias en el tiempo según la especie. En principio los efectos observados son mayores con Lac<sub>3</sub>Al. El balance de Na en Lac se hace más negativo con el tiempo de intoxicación, lo que está estrechamente relacionado al aumento de la excreción urinaria del catión. Por otra parte, también se ponen en evidencia en los últimos meses de tratamiento las fallas en la capacidad de concentrar la orina así como el incremento en la diuresis. Esto estaría vinculado al aumento progresivo del Al tanto en sangre como en tejido renal. En cambio, en Al<sub>2</sub>, los efectos mas acentuados se observan durante el primer mes de intoxicación, tanto en lo que respecta al balance y excreción de Na, como a la capacidad para concentrar la orina, y luego van paulatinamente mejorando con el transcurso del tiempo, persistiendo solo un aumento de la diuresis en las pruebas de concentración. Este efecto podría estar relacionado con la insolubilidad del com-

puesto, que al aumentar su concentración plasmática con el tiempo de administración disminuiría su ultrafiltrabilidad debido a la formación de coloides insolubles (16, 17). Esto disminuiría tanto su reabsorción tubular como su posible acción a nivel de transportadores.

Si bien el Al es un metal activo no reductor, puede actuar como pro-oxidante (7). Los datos obtenidos indican que la acumulación tisular de Al afecta el metabolismo celular promoviendo el estrés oxidativo a través de un aumento del marcador de peroxidación MDA (LPO), acompañado por la reducción de GSH. Este efecto fue similar en ambos grupos a nivel hepático, tejido donde la acumulación de Al fue similar. Sin embargo, en riñón se evidenció una disminución de GSH más marcada en Lac, lo que podría estar determinado por la mayor acumulación de Al en los animales intoxicados con dicho compuesto (6, 4). No obstante no se encontraron diferencias en los valores de LPO en los distintos grupos de tratamiento lo que podría estar indicando la acción de otros agentes antioxidantes.

Se conoce desde hace años que el Al interfiere con el estado hematopoyético tanto en pacientes urémicos como en animales de experimentación sometidos al mismo en variadas condiciones de toxicidad, particularmente referidas a distintas especies utilizadas, dosis, tiempo de administración, así como el período de vida en que se realizó la exposición de los animales (5, 18, 19, 20, 21). Nuestros datos reflejan un efecto de especiación Al dependiente sobre algunos parámetros del sistema hematopoyético periférico. Hemos observado que si bien ambas especies inducen una reducción del VCM y de la HCM a lo largo del tratamiento, el efecto es mucho más pronunciado en Lac. Esto trae como consecuencia que este grupo presente una anemia microcítica hipocrómica con reducción del Hto durante todo el tratamiento, mientras que el Al<sub>2</sub> manifiesta una microcitosis con hipocromía, acompañada de disminución del Hto solo en el 2º mes de tratamiento.

La aparición de la anemia microcítica hipocrómica está vinculada a déficit de Fe. Si bien esto fue observado en Al<sub>2</sub>, no estuvo presente en las ratas tratadas con Lac<sub>3</sub>Al. Esto último concuerda con lo publicado por Drüeke (5), quien observó anemia

microcítica sin cambios en la concentración sérica de Fe.

El valor de RDW, marcador de anisocitosis, se puede relacionar con la anemia. En el 1º mes se presentó muy elevado debido a la existencia de diferentes formas y tamaños de GR, y luego disminuyó, lo que indicaría uniformidad de tamaños, menores que los respectivos controles, efectos que fueron confirmados por microscopía óptica. Los valores de RDW, asociados a los del VCM, apoyan la teoría de una instalación, a lo largo del tiempo, de una anemia microcítica en Lac.

Discrepando con Kaiser (5) a pesar de la reducción en el Hto, VCM y HCM comprobamos con ambas especies, y mas acentuado con Lac, un aumento compensador en el número de hematies que sería responsable de las concentraciones de Hb prácticamente sin cambios, en Al<sub>2</sub>. En Lac, a pesar del mayor incremento del número de GR el acentuado descenso de la HCM mantendría la situación de anemia.

Si bien en los animales tratados con Lac<sub>3</sub>Al no varía la concentración plasmática de Fe, los cambios observados podrían estar vinculados a alteraciones en el metabolismo del Fe producidas por el Al unido a un determinado ligando, en este caso el lactato, y en mucho menor grado al hidróxido, compuesto de muy baja solubilidad y alta capacidad de hidrólisis.

Podemos concluir que el Lac<sub>3</sub>Al, por su mayor estabilidad y solubilidad, es capaz de inducir mayores efectos biológicos sobre funciones renales tubulares y metabólicas, así como sobre el sistema hematopoyético periférico. Sin embargo a nivel hepático, ambos compuestos inducen efectos similares sobre el metabolismo oxidativo al conseguirse igual acumulación mediante la administración de iguales concentraciones efectivas reales de Al.

## Bibliografía

1. Orihuela, D.; Perin, J. C. y Meichtry, V., 2003. Relación entre la especiación química del aluminio, analizada por espectroscopia FT-IR, y su efecto tóxico sobre el transporte intestinal de calcio *in vitro*. *FABICIB* 7: 87 – 95.
2. Zatta, P.; Zambenedetti, P.; Bruna, V. and Filippi, B., 1994. Activation of acetylcholinesterase by aluminum(III): The relevance of the metal species. *Neuro Report* 5: 1777 – 1780.

3. Tapparo, A.; Solda, L.; Bombi, G. G.; Zambenedetti, P.; Zatta, P.; Bertani, R. and Coraim, B., 1995. Analytical validation of a general protocol for the preparation of dose-controlled solutions in aluminum toxicology. *Analyst* **120**: 2425 – 2429.
4. Jeffery, E. H.; Abreo, K.; Burgess, E.; Cannata, J. B. and Greger, J. L., 1996. Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue and kidney. *J. Toxicol Environ Health* **48**: 649 – 665.
5. Garbossa, G. and Nesse, A., 2001. Aluminum toxicity in erythropoiesis. Mechanisms related to cellular dysfunction in Alzheimer's Disease. in *Aluminum and Alzheimer's Disease. The Science that describes the link*. C. Exley (editor). Elsevier Science.
6. Mahieu, S.; Gionotti, M.; Millen, N.; Elias, M. M., 2003. Effect of chronic accumulation of aluminum on renal function, cortical renal oxidative stress and cortical renal organic anion transport in rats. *Arch Toxicol* **77**: 605 – 612.
7. Exley, C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology and Medicine* **36**: 380 – 387.
8. Hair, F.F.; Tatham, R.L.; Black, W.C., 1999. "Análisis multivariante". Prentice Hall (Madrid). 5ª edición.
9. Littell, R.C.; Henrym, P.R.; Ammerman, C.B., 1998. Statistical Analysis on Repeated Measures Data Using SAS Procedures. *J. Anim Sci* **78**: 1216 – 1231.
10. Everitt, B.S., 1995. The Analysis of Repeated Measures: a Practical Review with Examples. *The Statistician* **1**, 44: 113 – 135.
11. Manual de uso del SPSS. Capítulo 16. Análisis de varianza con medidas repetidas. El procedimiento Modelo lineal general: Medidas repetidas.
12. Ellman, G. L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70 – 73.
13. Ohkawa, H.; Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**: 351 – 357.
14. Denner, Susana. 1996. "Análisis de orina". Centro de Publicaciones, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe)
15. Suwalsky, M., Norris, B., Kiss, T., Zatta, P. 2000. Effects of Al (III) speciation on cell membranes and molecular models. *Coord. Chem.Rev.* **228**, 285-295
16. Lote, C.J., Wood, J.A., Saunders, H.C. 1992. Renal filtration, reabsorption and excretion of aluminium in the rat. *Clin. Sci.* **1**; **82**(1):13-18.
17. Lote, C.J., Willmott, K., Wood, J.A., Thewles, A., Freeman, M. 1995. Renal excretion of aluminium in the rat: effect of citrate infusion. *Hum.Exp.Toxicol.* **14** (12): 945-948.
18. Hewitt, C.D., Innes, D.J., Herman, M.M., Savory, J., Wills, M.R. (1992). Hematological changes after long-term aluminum administration to normal adult rabbits. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **22** (2), 85 - 94.
19. Zaman, K., Zaman, W., Siddique, H. (1993). Hematological and enzymatic results of aluminum intoxication in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **150C**, 73 – 76.
20. Garbossa, G., Galvez, G., Castro, M.E., Nesse, A. (1998). Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 1. Impairment of erythropoiesis. *Human. Exp.Toxicol.* **17**: 312-317.
21. Mahieu, S., Contini, M., Gonzalez, M., Millen, N., Elias, M.M. (2000). Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicol. Lett.* **111**: 235-242.