

Trabajos

Alteración de parámetros reológicos en sangre de ratas crónicamente expuestas al aluminio y sometidas a hepatectomía parcial

RECIBIDO: 13/10/05

ACEPTADO: 20/2/06

Contini, M. del C.¹ • Bernal, C.² • González, M.¹ • Mahieu, S.¹ • Carnovale, C.³

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

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

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

Correspondencia: Bioq. María del Carmen Contini - Gral. López 2626, piso 11, Santa Fe, 3000 - TE: 0342-4580244 - mcontini@fbcbl.unl.edu.ar

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue analizar parámetros reológicos en sangre de ratas crónicamente expuestas al aluminio y sometidas a hepatectomía parcial. Ratas Wistar machos adultos fueron divididas en cuatro grupos experimentales (n=6 cada uno): Sham (cirugía simulada, SH); Al+SH; HP (48 hs de hepatectomía parcial) y Al+HP. La concentración plasmática de fibrinógeno mostró un aumento significativo en los grupos HP (68%), Al+SH (54%) y Al+HP (90%) respecto del SH, mientras que no existieron diferencias significativas del grupo Al+HP versus HP y Al+SH. Estos resultados sugerirían que ambos tratamientos podrían compartir los mecanismos de alteración del fibrinógeno. Por ello, sus efectos no se potenciarían. El incremento de la viscosidad

plasmática correlacionó en forma directa con el aumento en la concentración plasmática de fibrinógeno ($r_s = -0,689$, $p = -0,004$). La hepatectomía y el aluminio disminuyeron el índice morfológico (-136% y -194% respectivamente) e incrementaron el índice de rigidez (86% y 211% respectivamente) como la viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto 40% (31% y 14% respectivamente). Estas alteraciones mostraron un efecto aditivo sobre la membrana eritrocitaria cuando ambos tratamientos fueron considerados y explicarían la marcada anemia (descenso de Hto) observado en Al+SH y en HP, profundizándose en Al+HP, demostrando una potenciación de los efectos.

PALABRAS CLAVE: aluminio, hepatectomía parcial, eritrocitos, parámetros reológicos

SUMMARY: *Alteration of rheological parameters in the blood of rats chronically exposed to aluminum and subject to partial hepatectomy.*

Contini, M. del C.; Bernal, C.; González, M.; Mahieu, S.; Carnovale, C.

The aim of this work was to analyze the rheological parameters in the blood of rats chronically exposed to aluminum and subjected to partial hepatectomy. Adult male Wistar Rats were divided into four experimental groups: (n=6 each one): Sham (simulated surgery, SH); AI+SH; HP (48 hs of partial hepatectomy) and AI+HP. The fibrinogen plasmatic concentration showed a significant increase in the HP (68%), AI+SH (54%) and AI+HP (90%) groups with respect to SH, whereas no significant differences appeared when comparing the AI+HP group to HP and AI+SH. These results would suggest that the alteration mechanisms of

fibrinogen could be shared by both treatments. Thus, their effects would not be enhanced. The plasmatic viscosity increase was directly correlated with the increase in fibrinogen plasmatic concentration ($r_s = 0.689$, $p = 0.004$). Hepatectomy and aluminum decreased the morphological index (-136% and -194% respectively) and increased both the rigidity index (86% and 211% respectively) and the relative blood viscosity corrected to Hct 40% (31% and 14% respectively). These alterations showed an additive effect on the erythrocyte membrane when both treatments were considered and would explain the pronounced anemia (Hct decrease) observed in AI+SH and HP, which was even more pronounced in AI+HP, thus showing an enhancement of effects.

KEY WORDS: aluminum, partial hepatectomy, erythrocytes, rheological parameters

Introducción

El aluminio (Al) es considerado un metal no esencial y su disponibilidad biológica aumentada se ha relacionado con enfermedades tanto crónicas como agudas en humanos (1). Este metal aparece en el agua de bebida, en alimentos tales como productos derivados de granos, quesos procesados y sal. Además, productos farmacéuticos y tratamientos médicos pueden ser una importante ruta para la incorporación de altos niveles de Al. Por ejemplo, el hidróxido de Al es utilizado como un antiácido y como fosfato se lo encuentra en vacunas y en antitranspirantes. Finalmente, la biodisponibilidad por inhalación de Al aerotransportado soluble se demostró que constituía alrededor del 1.5% en el medio ambiente industrial (2). Debido a su ubicuidad, todos los seres humanos pueden estar expuestos a la ac-

ción potencialmente deletérea del Al. La acumulación del Al en diferentes órganos ha sido observada en pacientes sometidos a diálisis (3) o a largos períodos de nutrición parenteral (4). Estudios experimentales han demostrado que la administración de Al tanto por vía oral o por inyección intra-peritoneal, en diferentes especies de animales y por distintos períodos de tiempo causa anemia (5) (6).

El hígado tiene una notable capacidad de regeneración luego de la resección y en ratas se ha visto que la regeneración es completa a los 14 días de la cirugía hepática. Los pacientes pueden sobrevivir sin problemas después de una resección hepática del 70%. Frente a resecciones mayores el porcentaje de mortalidad varía entre 4 y 30% y complicaciones postoperatorias entre 25-50% (7). Las enfermeda-

des primarias del hígado o las metástasis son las principales razones para la cirugía hepática en muchos de los pacientes y el número de intervenciones está incrementando (8)(9). La capacidad de regeneración depende de diferentes factores y uno de los factores más importantes es la pronta recuperación de la circulación sanguínea (10)(11).

Dado que situaciones como la hepatectomía parcial pueden ser efectuada a pacientes que hayan estado sometidos a una alta exposición al Al y esto podría afectar parámetros reológicos en sangre que comprometerían aún más la regeneración hepática, nuestro objetivo fue analizar las potenciales modificaciones de los parámetros reológicos en sangre de ratas crónicamente expuestas al aluminio y sometidas a hepatectomía parcial.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratas macho, adultas, de la cepa Wistar. Los animales fueron mantenidos en jaulas metabólicas individuales en ambiente acondicionado, con ciclo luz-oscuridad de 12 hs / 12 hs, temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y dieta estándar "ad libitum".

Se trabajó con cuatro grupos experimentales ($n=6$ cada uno). Los animales fueron divididos en dos grupos experimentales: tratados (Al) o no con hidróxido de aluminio en solución fisiológica en una dosis de 27 mg de Al elemental/kg de peso corporal, 3 veces/semana por vía i.p. (12)(13)(14). A los 90 días de tratamiento los mismos fueron subdivididos en los grupos con hepatectomía parcial del 65% según la técnica de Higgins y Anderson (15) y estudiadas a las 48 hs de la cirugía (HP) o Sham (cirugía simulada, SH). De esta forma se conformaron los cuatro grupos de estudio: SH, HP, Al+SH, Al+HP.

El día del experimento, los animales en ayunas fueron anestesiados con pentobarbital

sódico (50 mg/Kg) y se les extrajo sangre con y sin anticoagulante.

Determinaciones bioquímicas

•Aluminio: la muestra de sangre se extrajo con heparina como anticoagulante. Se determinó la concentración de Al por espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer 5000). Los resultados fueron obtenidos a partir de una curva de calibrado con estándares acuosos certificados.

•Fibrinógeno: la muestra de sangre se tomó con citrato de sodio como anticoagulante en relación 1/9. Se determinó la concentración de fibrinógeno en plasma por turbidimetría.

Determinaciones hemorreológicas

Se realizaron los ensayos reológicos de acuerdo a la guía del Comité para la Estandarización en Hematología. (16)

•Hematocrito (Hto): fue realizado por método de microhematocrito y procesado en un contador hematológico (Cell Dyn 3500).

•Filtrabilidad: fueron realizadas con la técnica descrita por Reid y col. (17), para ello los glóbulos rojos (GRs) fueron resuspendidos a hematocrito del 10% en solución salina (PBS) pH: 7,4; 285 mOsm/L y conteniendo 0,25% de albúmina bovina. La suspensión fue filtrada a través de membranas de policarbonato de 13 mm (Nucleopore Corr, USA) con poros de 5mm de diámetro y una presión negativa de 10 cm H₂O. Los resultados se expresaron como índice de rigidez (IR):

$$IR = (t_s - t_0) / t_0 \times (100/Hto)$$

Donde t_s es el tiempo de pasaje de la suspensión de GRs; t_0 es el tiempo de pasaje del PBS, y Hto del 10% de la suspensión de GRs. IR estimado por filtrabilidad, es una estimación

de la rigidez eritrocitaria que es la inversa de la deformabilidad eritrocitaria.

•Viscosidad de sangre entera (0s): la muestra de sangre entera se obtuvo con EDTA como anticoagulante. Las mediciones fueron realizadas utilizando un viscosímetro cono-plato Wells-Brookfield, a Hto nativo, 37° y velocidad de corte de 230 s⁻¹.

•Viscosidad plasmática (0p): la muestra de plasma fue obtenida de sangre anticoagulada con EDTA. Las mediciones fueron realizadas usando el viscosímetro de cono-plato Wells-Brookfield a velocidad de corte de 230 s⁻¹.

•Viscosidad sanguínea relativa a Hto estándar de 40% (0r corregida): dado que la viscosidad sanguínea es determinada por la viscosidad plasmática, el hematocrito y la deformabilidad eritrocitaria, se calculó el valor de viscosidad relativa (0s/0p) a Hto estándar del 40%, que muestra la fluidez de la sangre sin la influencia del Hto mediante la ecuación:

$$0r \text{ Hto } 40\% = 0r \text{ Hto nativo} \cdot 40/\text{Hto}$$

•Forma celular: una alícuota de la suspensión salina de eritrocitos normales conteniendo albúmina al 1% se colocó sobre un portaobjeto y se observó con un microscopio invertido.

De acuerdo a la clasificación de Bessis, se pueden distinguir 9 formas y asignarles un valor a cada uno: disco bicóncavo (índice 0); tres tipos de estomatocitos (índices -1, -2, -3); esferoestomatocitos (índice -4); tres tipos de equinocitos (índice +1, +2, +3); esferoequinocitos (índice +4). Se contaron y clasificaron 200 células/muestra y se calculó un índice morfológico (IM) como:

$$\text{IM} = \frac{\sum(\text{índice de forma} \times \text{número de células con esa forma})}{\text{número total de células}}$$

Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron expresados como la media \pm EEM. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas mediante análisis de variancia (2 x 2 ANOVA), seguido por el test de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativamente diferente. Las correlaciones fueron analizadas por el método de regresión de Spearman.

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 del tratamiento, 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 ± 4 g vs 335 ± 10 g, respectivamente).

La concentración plasmática de Al (mg Al/L plasma) mostró una alta dependencia por el tratamiento con el mineral: SH: 9 ± 4 ; HP: 8 ± 6 ; Al+SH: $750 \pm 55^*$; Al+HP: $820 \pm 42^*$; * $p < 0,05$ vs su respectivo control sin Al.

Los valores de Hto obtenidos fueron los siguientes: SH: $45,2 \pm 1,4$; HP: $39,1 \pm 2,4^*$; Al+SH: $40,5 \pm 2,0^*$; Al+HP: $33,4 \pm 1,9^* \emptyset^*$. * $p < 0,05$ respecto del grupo SH; $\emptyset p < 0,05$ versus HP y * $p < 0,05$ versus Al+SH.

En la figura 1 puede observarse los valores de concentración plasmática de fibrinógeno y la viscosidad plasmática (0p) obtenidos para los cuatro grupos experimentales.

En la figura 1. A. se observa que la concentración plasmática de fibrinógeno respecto del SH mostró un aumento significativo del 68% en el grupo HP, del 54% en Al+SH y del 90% en Al+HP, no existiendo una diferencia significativa del grupo Al+HP con respecto al grupo HP ni con respecto al grupo Al+SH. La 0p (figura

1.B) mostró un aumento significativo respecto del SH del 13% en el grupo HP, del 17% en AI+SH y del 20% en AI+HP, no existiendo un efecto aditivo de los tratamientos con AI y HP. El incremento de la viscosidad plasmática correlacionó en forma directa con el aumento en la concentración plasmática de fibrinógeno ($r_s = 0,689$, $p = 0,004$) (ver figura 1-C).

En la figura 2 pueden observarse los valores del índice morfológico (IM), el índice de rigidez (IR) y la viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto 40 obtenidos para los cuatro grupos experimentales. El índice morfológico (Figura 2-A) mostró una disminución significativa con respecto al grupo SH en HP (-136%), en AI+SH (-194%) y en AI+HP (-219%), existiendo una diferencia significativa del grupo AI+HP (disminución del 35%) con respecto al grupo HP y una disminución no significativa del 10% con respecto al grupo AI+SH. En el IR (figura 2-B) se observó comparado con el grupo SH, un incremento del 86% en el grupo HP, para el grupo AI+SH el aumento fue del 211% y del 327% en el grupo AI+PH; existiendo un efecto aditivo de los tratamientos AI y HP.

La viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto 40 (figura 2-C) mostró un aumento significativo por la hepatectomía parcial (31%) como por el tratamiento con AI (14%) y ambas variables mostraron un efecto aditivo (170%).

Discusión

Muchos autores confirman la influencia dominante de la molécula de fibrinógeno sobre la viscosidad plasmática, debido a que las mismas tienen la forma y el tamaño adecuados para facilitar un puente entre los eritrocitos, variando la capacidad de agregación y sedimentación eritrocitaria y aumentando la viscosidad plasmática (18)(19)(20). En concordancia con estos estudios, nosotros observamos

que la concentración de fibrinógeno plasmático muestra una asociación directa con la viscosidad plasmática ($r_s = 0,689$, $p = 0,004$). Tanto la HP como el tratamiento con AI producen un incremento de la concentración plasmática de fibrinógeno y el consecuente aumento significativo de la viscosidad plasmática. La combinación del tratamiento con AI y la posterior resección del 65% de la masa hepática (HP) no muestra una modificación sumatoria. Este hecho permite hipotetizar que los mecanismos por los que ambos tratamientos incrementan el fibrinógeno son compartidos por lo que dichos efectos no se potencian. Por ser el fibrinógeno un componente de las llamadas "proteínas de la fase aguda", es posible que una injuria severa, como la que representa una HP sea la causante de dicha alteración (21)(22). Con respecto al AI no existen estudios de su efecto sobre los niveles plasmáticos del fibrinógeno. Se ha descrito que las intoxicaciones con AI producen severas encefalopatías en animales de experimentación y en seres humanos (23), también se lo reconoce como una de las causas de la enfermedad de Alzheimer, en la cual se ha descrito una respuesta inflamatoria específica que indica la inducción de genes de rutas proinflamatorias (24).

En base a estas observaciones podría especularse que el AI podría inducir el aumento de las "proteínas de la fase aguda" entre las cuales se encuentra el fibrinógeno de una manera similar a lo descrito para la HP.

La forma de disco bicóncavo del eritrocito humano normal se relaciona estrechamente con sus funciones. Este disco bicóncavo es más deformable que la esfera y puede someterse a cambios que sean necesarios para optimizar el movimiento a través de la microcirculación. La deformabilidad celular depende tanto de la membrana como del citoplasma, sin embargo el citoplasma de eritro-

citocitos normales actúa como un líquido ideal y a concentraciones fisiológicas tiene muy baja viscosidad. Por lo tanto, la elasticidad y la viscosidad de la membrana son cruciales para mantener la deformabilidad (25). Nuestros resultados muestran una disminución del IM en los grupos HP, AI+SH y AI+HP, debido a un aumento en la proporción de estomatocitos que son menos deformables, contribuyendo, por lo tanto, al aumento significativo del índice de rigidez determinado por el método de filtrabilidad así como estimado por la viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto estándar del 40%. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado una asociación entre el descenso del colesterol plasmático y el aumento de la proporción de eritrocitos no-discocitos, que son menos deformables y contribuyen a un aumento en el IR (26)(27)(28).

Teniendo en cuenta estos estudios, la aparición de formas no discocíticas en HP podría deberse, en parte, a la disminución del nivel plasmático de colesterol observado 48 horas post-hepatectomía, descrito por Jeffrey Field y col. (29), así como determinado en nuestros animales (colesterol plasmático (mg/dl), SH: $64,5 \pm 1,55$; HP: $47,3 \pm 3,75$ *, * $p < 0,05$). Teniendo en cuenta la hipótesis de la bicapa acoplada, los cambios morfológicos se pueden deber a un desbalance entre ambas monocapas que constituyen la membrana del eritrocito (30).

La variación de forma reflejada en los grupos tratados con AI podría deberse a una interacción del catión con los fosfatos de las cabezas fosfolípídicas de la hemicapa externa que conduce a una disminución del área superficial externa de la membrana, además el AI puede causar una redistribución de los lípidos de la bicapa afectando la forma bicóncava de los glóbulos rojos, como ha sido postulado por otros autores (31)(32).

La mayor disminución del IM en el grupo AI+HP sugiere la combinación de los efectos producidos por HP, por un lado y por el otro, el del AI sobre la membrana de los eritrocitos, produciendo un efecto sumatorio de los efectos individuales de ambos tratamientos.

El descenso significativo de Hto observado tanto en animales del grupo HP y del grupo AI+SH, permite poner en evidencia la presencia de una marcada anemia, que en el tratamiento combinado (AI+HP) se profundiza demostrando que existiría una potenciación de los efectos individuales de ambos tratamientos. Esta disminución significativa de los eritrocitos circulantes podría explicarse por un aumento del atrapamiento de los glóbulos rojos por parte de los componentes celulares del sistema macrofágico-monocítico. Se ha descrito, que la alteración de la forma de los eritrocitos de discocitos a estomatocitos, los cuales presentan menor deformabilidad, explica el aumento del atrapamiento de los glóbulos rojos por parte del sistema macrofágico-monocítico conduciendo a la aparición de una anemia (33)(34).

Podemos concluir que las alteraciones de parámetros reológicos evaluados en sangre pueden ser factores coadyuvantes en la anemia observada en animales crónicamente expuestos al aluminio y sometidos a hepatectomía parcial. A pesar de las limitaciones que existen para extrapolar resultados experimentales en animales al humano, el presente estudio puede ser útil para mejorar nuestra comprensión de los posibles efectos deletéreos del AI sobre los eritrocitos y el comportamiento reológico de la sangre en sujetos, que han estado expuestos al metal por razones medicamentosas o por el medio ambiente y que deben ser sometidos a una hepatectomía parcial.

Figura 1

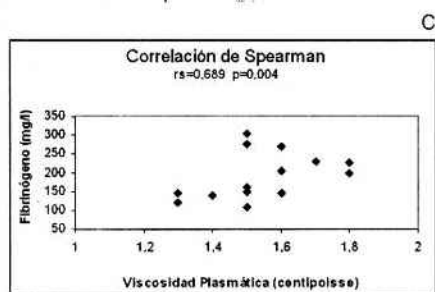
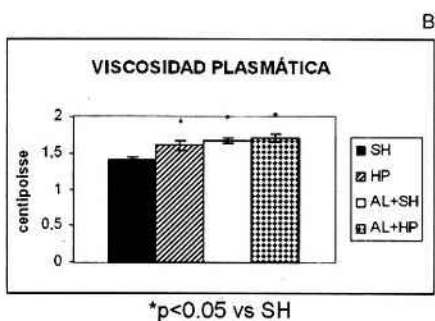
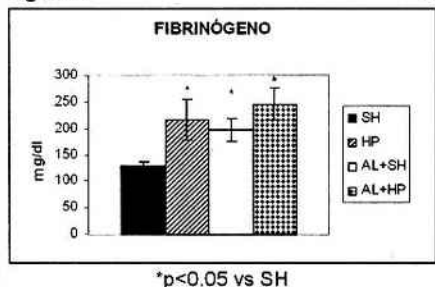
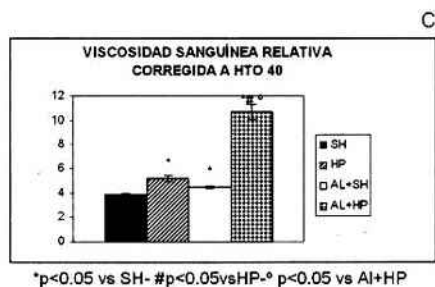
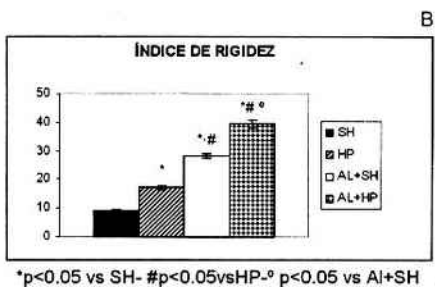
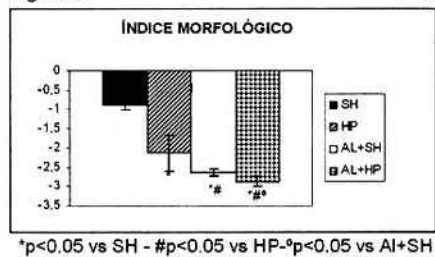


Figura 2



Bibliografía

1. Exley, C. (2004): The pro-oxidant activity of aluminum. *Free radical Biology and Medicine*. **36** (3): 380-387.
2. Yokel, R.A. and McNamara P.J. (2001): Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol Toxicol*. **88** (4): 159-67.
3. Alfrey, A.C.; LeGendre, G.R. and Kaehny, W.D. (1976): The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med*. **294**: 184-188
4. Klein, G.L. (1993): Aluminum and hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology*. **104**(5): 1583-4.
5. Garbossa, G.; Gutnisky, A. and Nesse, A. (1996): Depressed erythroid progenitor cell activity in aluminum-overloaded mice. *Miner Electrolyte Metab*. **22**(4): 214-8.
6. Kaiser, L.; Schwartz, K.A.; Burnatowska-Hledin, M.A. and Mayor, G.H. (1984): Microcytic anemia secondary to intraperitoneal aluminum in normal and uremic rats. *Kidney Int*. **26**(3): 269-74.
7. Stimpson, R.E.; Pellegrini, C.A.; Way, L.W. (1987): Factors affecting the morbidity of elective liver resection. *Am J Surg*. **153**(2): 189-96
8. Skullman, S.; Wiren, M.; Garlick, P.J.; McNurlan, M.A. and Larsson, J. (1994): Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. *J Hepatol*. **21**(2): 174-81.
9. 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.
10. Hortelano, S.; Dewez, B.; Genaro, A.M.; Diaz-Guerra, M.J. and Bosca, L. (1995): Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology*. **21**(3): 776-86.
11. Wang H. and Wayne L. (1998): Evidence of nitric oxide, a flor-dependent flor, being a trigger of liver regeneration in rats. *J. Physiol. Pharmacol/Rev.Can. Physiol. Pharmacol*. **76**(12): 1072-1079.
12. 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.
13. Calvo, M.L.; Mahieu, S.; Millen, N.; González, M.A.; Contini, M.C. (1998): Evaluation of biochemical parameters in aluminized rats. *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana*. **48**: 32-40.
14. Mahieu, S.; Contini, M.C.; Millen, N.; Gonzalez, M.; Elias, M.M. (2000): Aluminum toxicity. Hematological effects. **111**: 235-242.
15. 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.
16. International Committee for Standardization in Hematology. Expert panel on blood rheology. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. 1986. *Clin. Hemorheol*. **6**: 439-453.
17. Reid, H.L.; Barnes, A.J.; Lock, P.J.; Dormandy, J.A. and Dormandy, T.L. (1976): A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J. Clin. Pathol*. **29**: 855-858.
18. Angelkort, B.; Amann, B. and Lawall, H. (2002): Hemorheology and hemostasis in vascular disease. A pathophysiological review. *Clin Hemorheol Microcirc*. **26**(3): 145-54.
19. Marton, Z.; Kesmarky, G.; Vekasi, J.; Cser, A.; Russai, R.; Horvath, B. and Toth, K. (2001): Red blood cell aggregation. measurements in whole blood and in fibrinogen solutions by different methods. *Clin Hemorheol Microcirc*. **24**(2): 75-83.

20. London, M. (1997): The role of blood rheology in regulating blood pressure. *Clin Hemorheol Microcirc.* **17**(2): 93-106.
21. Suc B., Paris Y., Belghiti J., Fekete F. (1992): 'Natural history' of hepatectomy. *Br. J. Surg.* **79**(1): 39-42, 1992.
22. Antovic J., Djordjevic V., Kocic G., Koracevic D., Bjelakovic G., Bakic M. (1993): Blood coagulation factors changes during liver regeneration in rats, *Arch. Int. de Physiologie, de Biochimie et Biophysique* **101**: 357-359.
23. Bugiani O. & Ghetti B. (1990): Aluminum encephalopathy: Experimental vs human. In: *Aluminum and Renal Failure*. Ed. M. Debroe, J.W. Coburn. Kluwer Academia Publishers. *Developments in Nephrology*. **26**: 109-126.
24. Lukiw W.J., Bazan N.G. (2000): Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* **25**(9-10): 1173-84 .
25. Telen, M.J. (2000). Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Semin Hematol.* **37**(2): 130-42.
26. Fawcett, J.P.; Menkes, D.B. (1994): Does cholesterol depletion have adverse effects on blood rheology?. *Angiology* **45**(3): 199-206.
27. Chailley, B.; Giraud, F.; Claret, M. (1981): Alteration in human erythrocyte shape and the state of spectrin and phospholipid phosphorylation induced by cholesterol depletion. *Biochem. Biophys Acta* **643**: 636-641.
28. Ferrero, M.; Dominighini, A.; Mengarelli, G.; Ronco, M.T.; Alvarez, M.L.; Wagner, M.; Gurni, A.; Carnovale, C.; Luquita, A. (2004): Hemorrhheologic changes induced by aqueous extract of *Ligaria cuneifolia*: Treatment by two administration routes. *Clinical Hemorrhheology and Microcirculation* **31**(2): 113-120.
29. Jeffrey Field J., Mathur S.N., Labrecque D. R. (1985): Colesterol metabolism in regenerating liver of the rat. *Am. J. Physiol.* **249** (Gastrointest. Liver Physiol. **12**: G679-G684.
30. Sheetz, M.P and Singer, S.J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci* **71**(11): 4457-4461.
31. Suwalsky, M.; Norris, B.; Villena, F.; Cuevas, F.; Sotomayor, P.; Zatta, P. (2004): Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes *Food Chem Toxicol.* **42**(6): 925-933.
32. Vittori, D.; Garbossa, G.; Lafourcade, C.; Pérez, G.; Nesse, A. (2002): Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium. *Biochim. et Biophys Acta* **1558**: 142-150.
33. Sutura S.P & Krogstad D.J. (1991): Reduction in surfase-volume ratio: A physical mechanism contributing to the loss of red cell deformability. *Biorheology* **28**: 221-229.
34. Drondrop PM.; Angus B.J.; Chotivanich K.; Silamut K., Ruangngaverayuth R., Hardeman M. R.; Kager PA.; Vrecker J. & White N.J. (1999): Red blood cell deformability as predictor of anaemia falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 733-737.