

Trabajos

Dimorfismo sexual en los efectos del aluminio sobre la función renal en ratas wistar

RECIBIDO: 1/7/08

ACEPTADO: 8/10/08

Contini, M.C. • Millen, N. • González, M. • Mahieu, S.

Laboratorio de Investigaciones Fisiológicas Experimentales (LIFE).
Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas. Universidad Nacional
del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. CC 242. (3000)
Santa Fe. Argentina. Tel: 0342-4575206- Int.157/162.
Email: smahieu@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se estudió la influencia de la diferencia de sexo en los efectos del aluminio sobre la función renal. Se trabajó con ratas hembras intactas y ovariectomizadas y machos tratados crónicamente con lactato de aluminio (Al) por 12 semanas. En los estudios de balance solo los machos mostraron un aumento en la excreción de agua y sodio, con reducción en la osmolaridad de la orina. Todos los grupos tratados con Al presentaron una reducción en la capacidad para concentrar la orina ante la administración de desmopresina. En los machos tratados los cambios estuvieron asociados a un incremento en la concentración de aldosterona y la actividad de Na/K-ATPasa; en las hembras sólo aumentó la concentración de aldosterona que en estas condiciones permitiría mantener el balance de sodio en las mismas. Los machos presentaron mayor susceptibilidad para desencadenar estrés oxidativo caracterizado por un aumento de lipoperoxidación (LPO),

reducción de glutatión (GSH) y disminución de la actividad de glutatión peroxidasa y catalasa. Las hembras si bien redujeron la actividad de dichas enzimas no modificaron la LPO ni GSH. Los machos serían mas sensibles que las hembras a la injuria renal inducida por el Al, sin embargo no se puede asignar este efecto protector a la presencia de los estrógenos.

PALABRAS CLAVE: Aluminio, sexo, función renal, estrés oxidativo.

SUMMARY: *Sexual dimorphism in the aluminium effects on wistar rats renal functions.*

Gender differences in the effects of aluminium (Al) on the renal function were studied. Intact and ovariectomized female rats and male rats chronically treated with aluminium lactate for 12 weeks were employed in this work. In the balance studies, only the treated male rats showed an increase in water and sodium excretion with a reduction in urine osmolarity. All the Al treated groups

could develop a deficiency in urinary concentrating ability under desmopressin administration. As for the male rats, the changes were related to an increase in the aldosterone concentration and to the Na/K-ATPase activity; about the female rats, there was only an increase in aldosterone concentration which, according to these terms and conditions, would allow keeping the sodium balance. The male ones were more sensitive to trigger oxidative stress, which is characterized by an increase in

the level of lipid peroxidation (LPO), a decrease in level glutathione (GSH) and a decrease in the glutathione peroxidase and catalase activity in kidney. Although the female rats reduced those enzymes, they did not modify either LPO or GSH. The males would be more susceptible than the females to renal injury induced by Al; however, this protective effect cannot be assigned to the estrogen presence.

KEYWORDS: Aluminium, sex, renal function, oxidative stress.

Introducción

La incidencia y prevalencia de la enfermedad renal terminal es más alta en el hombre que en la mujer (1). Asimismo, la velocidad de progresión de la enfermedad renal crónica, es generalmente más rápida en el hombre que en la mujer (2). Si bien el efecto protector en el género femenino y especialmente de las hormonas sexuales sobre el desarrollo y progresión de la arteriosclerosis y enfermedad coronaria ha sido extensamente estudiada (3) no hay mucha información entre la interrelación del género y alteraciones de la función renal.

El impacto del género sobre la enfermedad renal se ha observado en animales de experimentación. Ratas machos, de edad avanzada, desarrollan proteinuria y glomérulo esclerosis, mientras que las hembras y los machos con orquiectomía son resistentes al desarrollo de enfermedad renal (4). Se han detectado en riñón tanto receptores para testosterona como para estradiol (5) y las hormonas sexuales pueden influenciar diferentes procesos a nivel renal. Estas hormonas podrían jugar un papel relevante en la diferente sensibilidad ligada al sexo observada frente a distintas injurias rena-

les. Existen diferencias de sexo en los sistemas oxidativos-antioxidativos (6,7), siendo el grado basal de oxidación mayor en machos que en hembras (8).

El efecto de falla renal con acumulación de aluminio (Al) en diferentes órganos y la consiguiente intoxicación sistémica está bien estudiada, pero hay pocos trabajos sobre la nefrotoxicidad inducida por el mismo. El Al es excretado fundamentalmente por orina y se han sugerido diferentes mecanismos de eliminación renal tales como filtración glomerular (9), reabsorción tubular (10) y excreción en túbulos distales (11). Se ha reportado, además que la acumulación de Al en riñón promueve degeneración de células tubulares y podría inducir nefrotoxicidad (11, 12).

En estudios previos, trabajando con ratas Wistar machos hemos reportado que la acumulación de aluminio en tejido renal afecta el metabolismo celular, promueve el estrés oxidativo, induce alteraciones en el transporte tubular de ácido p-amino-hipúrico y reabsorción tubular de fosfatos, así como cambios en los balances de agua y sodio y una disminución la capacidad de concentrar la orina, sin cambios importan-

tes en la función renal global (14, 15, 16,17). Los hallazgos del efecto del Al sobre el estado oxidativo renal refuerzan el rol del calcio como agente prooxidante (18).

El propósito del siguiente trabajo fue diseñado para investigar las posibles diferencias de sexo en la función renal de ratas tratadas crónicamente con lactato de aluminio y la posible vinculación a cambios en los sistemas oxidativos/antioxidativos.

Materiales y métodos

Animales y tratamiento

Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos de 2 meses de edad. Los animales fueron mantenidos en jaulas metabólicas a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Recibieron dieta estándar conteniendo aproximadamente 130 mmol/kg de sodio, 160 mmol/kg de potasio y 23% de proteínas, y agua ad libitum. Fueron divididas en seis grupos (n=10 cada uno) de acuerdo al sexo, tratamiento con lactato de aluminio (Al) y ovariectomía según: machos control (MC), hembras intactas (HC), hembras con ovariectomía (HOVX), machos tratados con Al (MAI), hembras tratadas con Al (HAI), hembras ovariectomizadas y tratadas con Al (HOVXAI).

Los ovarios fueron removidos en los grupos ovariectomizados a los 2 meses de edad. El tratamiento en todos los grupos se inició al completarse 20 días de dicha cirugía, previo control de la misma a través de frotis vaginales.

La dosis de Al, frecuencia y vía de administración fueron descritas previamente (17). Los animales tratados con Al fueron inyectados intraperitonealmente tres veces por semana, durante 12 semanas con una solución de lactato de aluminio conteniendo 0.57 mg Al y 5.68 mg anión lactato (pH 7.0), por 100 gramos de peso corporal. Los

otros grupo recibieron solución de lactato de sodio por vía ip con 5.68 mg anión lactato (pH 7.0) por 100 gramos de peso corporal durante el mismo tiempo y con la misma frecuencia.

Se controló el ciclo estral de todos los grupos de ratas hembras a través de frotis vaginales durante 10 días por mes de tratamiento.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones enunciadas en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" del National Research Council de los Estados Unidos de Norteamérica, del año 1996.

Estudios Metabólicos

Después de 12 semanas de tratamiento, ratas (n=6) de cada grupo fueron alojadas en jaulas metabólicas a fin de obtener la excreción de orina así como la ingesta de alimento y agua en 24 horas. Los animales recibieron agua desmineralizada y dieta estándar conteniendo 129 mmol Na/kg. El balance diario de sodio fue calculado como el sodio ingerido menos el sodio excretado. Después de 2 días de adaptación se midieron los balances de agua y sodio durante 2 días.

Se realizó otro experimento para evaluar la capacidad para concentrar la orina. Las ratas fueron privadas de agua durante 18 h y luego se les administró por vía im 1-deamino-[8-D-arginina]-vasopresina (DDAVP, 1 nmol /100 g peso), un agonista de la vasopresina selectivo para receptores V2. Muestras de orina fueron colectadas a los 120 minutos para obtener la osmolaridad.

Estudio de la función renal

Los animales de cada grupo (n=5) fueron preparados para estudios de clearance como fuera descrito antes (14). Se anes-

tesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal). Se cateterizaron la vena y la arteria femoral (P50) y se insertó un catéter en vejiga por incisión suprapúbica. Los animales se mantuvieron en jaulas de contención durante todo el experimento. Por vena femoral se infundió una solución conteniendo inulina (1g/100 ml), p-aminohipurato de sodio (0,3 g/100 ml) y solución salina isotónica a una velocidad constante de 4.1 ml/h en machos y 3 ml/h en hembras usando una bomba de infusión (Sage Instruments, model 341-B). Después de un período de equilibración de 1 hora, se obtuvieron muestras de orina durante dos períodos de 30 minutos y una muestra de sangre por arteria femoral en el medio de cada período. Al finalizar el experimento se extrajo sangre por punción cardiaca, los riñones fueron removidos rápidamente y descapsulados. Este tejido fue utilizado para evaluar el estado oxidativo, obtener membranas plasmáticas totales y determinar el contenido tisular de Al.

Se midió el volumen urinario por gravimetría y se obtuvieron la velocidad de filtrado glomerular (VFG) por el clearance de inulina, y el flujo plasmático renal cortical (FPRC) a través del clearance de p-aminohipurato (Cl PAH) por fórmulas convencionales. A fin de estudiar la función tubular se estimaron las excreciones fraccionales de agua y sodio (EF% H₂O y EF% Na) también por fórmulas convencionales. Se midió la osmolaridad de la orina y del suero. Se determinaron las concentraciones de aldosterona, testosterona, estradiol, aluminio, sodio y potasio en muestras de suero.

Estudios bioquímicos en tejido renal

El tejido renal fue homogeneizado a fin de medir la actividad citosólica de las en-

zimas antioxidantes: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT), el pool de sulfhidrilos no proteicos (fundamentalmente glutatión – GSH) y los niveles de lipoperoxidación (LPO).

Para obtener la actividad enzimática se prepararon homogenados renales con solución de buffer fosfato 50mM Na₂EDTA 0.001M (pH 7.4). La actividad de GPx fue medida por el método de Lawrence y Burk (19), la de GR por el método de Horn (20) y la de catalasa por el método de Aebi (21).

El contenido de GSH se evaluó por espectrofotometría en homogenados preparados con ácido tricloroacético al 5% en HCl 0.01 M según Ellman (22). La LPO se midió como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método de Okhawa (23), en homogenados preparados en solución de KCl al 1.15%. Se determinó la concentración de proteínas en los homogenados renales por el método de Lowry (24).

Actividad de Na⁺ / K⁺ ATPasa y Gamma Glutamil Transferasa (GGT) en membranas plasmáticas totales

Se homogeneizó la corteza renal en una solución de sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Se obtuvieron las membranas plasmáticas totales por centrifugación y en las mismas se estimaron las actividades de Na⁺ / K⁺ ATPasa y GGT. La actividad de la Na⁺/ K⁺ ATPasa fue obtenida como la diferencia entre las cantidades de fosfato inorgánico liberado en la presencia de K⁺ (ATPasa total) y en ausencia de KCl y presencia de ouabaina 2 mM. Se utilizó como medio de incubación el descripto por Koshier (25) y el fosfato inorgánico fue determinado por el método de Summer (26). La actividad de la GGT se midió con un equipo comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Métodos Analíticos

Las concentraciones de aldosterona, testosterona y estradiol fueron obtenidas por radioinmunoensayo (Coat-A-Count Aldosterone, Testosterone, Estradiol Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Las concentraciones de inulina y PAH en las muestras de suero y orina fueron determinadas por el método de Roe (27) y el método de Brun modificado por Waugh and Beall (28) respectivamente. Las concentraciones de sodio y potasio en suero y orina fueron determinadas por fotometría de llama y la osmolaridad en suero y orina se obtuvo con un osmómetro Vapro 5520 (Wescor).

Las determinaciones de Al en suero y tejido renal se realizaron por atomización electrotérmica en condiciones STPF, utilizando un Espectrómetro Perkin Elmer Analyst 800. Las muestras de tejido se trataron previamente con un digestor Milestone Ethos 900.

Los frotis vaginales se colorearon con la tinción de Harris-Shorr.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm ESM. En todos los casos fueron comparadas las medias entre grupos. Las variables fueron analizadas con ANOVA se-

guido por el test de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativamente diferente. El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS (1995).

Resultados

Como indicáramos en trabajos previos no se observaron signos clínicos anormales, ni cambios en el comportamiento de los animales por el tratamiento con Al. Todos los grupos expuestos al Al mostraron un aumento significativo tanto en las concentraciones séricas como a nivel del tejido renal. En las hembras la concentración sérica de Al se incrementó más, sin embargo no se observaron diferencias relacionadas con el sexo en la acumulación a nivel renal (tabla 1). Las hembras controles y las tratadas con Al mostraron tanto un ciclo estral, como concentraciones séricas de E2 normales ($26,7 \pm 3,5$ pg/ml). Los grupos con OVX presentaron diestro permanente y concentraciones séricas de E2 por debajo de 5 pg/ml. Las concentraciones de testosterona (ng/ml) en los grupos MC y MAI fueron $6,1 \pm 0,1$ y $5,9 \pm 0,2$ respectivamente.

No se observaron diferencias significativas en la ingesta de alimentos ni en el peso

Tabla 1: Concentraciones séricas y renales de Al en los distintos grupos al completar 12 semanas de tratamiento. Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 5.

[Al] s: concentración sérica de aluminio.

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con Al; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas tratadas con Al; (MC) machos control; (MAI) machos tratados con Al.

	HC	HAI	HOVX	HOVXAI	MC	MAI
[Al] s μ g/l	$6,5 \pm 0,4$	$920 \pm 20^{*}\#$	$5,9 \pm 0,4$	$940 \pm 17^{*}\#$	$8,5 \pm 1,1$	$660 \pm 25^{*}$
Al riñón μ g/g	$1,8 \pm 0,3$	$39,1 \pm 1,4^{*}$	$2,1 \pm 0,2$	$41,3 \pm 1,2^{*}$	$2,5 \pm 0,5$	$36,8 \pm 1,2^{*}$

* diferencia significativa respecto a las ratas no tratadas con Al para $p < 0,05$

diferencia significativa por sexo en ratas tratadas con Al para $p < 0,05$

corporal entre los distintos grupos de ratas hembras, ni entre los grupos de ratas machos, durante el tratamiento (tabla 2).

Efectos de la administración crónica de AI sobre la excreción de agua y sodio.

Los datos obtenidos después de 12 semanas de tratamiento se presentan en la tabla 3, donde se pueden observar diferencias por sexo en la ingesta de sodio, diuresis y osmolaridad de la orina y solo modificaciones significativas por el AI en algunos

parámetros de las ratas machos (aumento de la excreción de sodio y agua, reducción en la osmolaridad urinaria).

Los resultados obtenidos en los estudios para examinar la capacidad para concentrar la orina utilizando DDAVP se pueden observar en la figura 1. Todos los grupos tratados con AI mostraron una reducción en la habilidad para eliminar una orina concentrada. En el grupo HAI la disminución de la capacidad para concentrar la orina fue mas acentuada que en el grupo HOVXAI.

Tabla 2: Peso corporal e ingesta de alimento en los distintos grupos al completar 12 semanas de tratamiento. Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 7

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con AI; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas tratadas con AI; (MC) machos control; (MAI) machos tratados con AI.

	HC	HAI	HOVX	HOVXAI	MC	MAI
Ingesta alimento (g)	14,7 \pm 0,30	14,8 \pm 0,7	14,6 \pm 0,71	14,9 \pm 0,77	18,0 \pm 0,71*	17,7 \pm 0,72*
Peso corporal (g)	269 \pm 14	275 \pm 19	277 \pm 11	268 \pm 15	363 \pm 24*	372 \pm 28*

* diferencia significativa por sexo p < 0,05

Tabla 3: Balances de agua y sodio en los distintos grupos al completar las 12 semanas de tratamiento. Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 7

[Osm]u : osmolaridad urinaria

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con AI; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas y tratadas con AI; (MC) machos control (MAI), machos tratados con AI. Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes para p < 0.05

Grupos	Ingesta Na mmol/d	Excreción Na mmol/d	Ingesta H2O ml/d	Diuresis ml/dl	[Osm]u mOsm/l
HC	1,89 \pm 0,04 ^a	1,46 \pm 0,05 ^a	27,05 \pm 1,76 ^a	12,82 \pm 0,81 ^a	1750 \pm 91 ^a
HAI	1,82 \pm 0,09 ^a	1,59 \pm 0,07 ^a	28,75 \pm 1,53 ^a	14,35 \pm 0,79 ^a	1594 \pm 83 ^a
HOVX	1,82 \pm 0,13 ^a	1,40 \pm 0,12 ^a	26,58 \pm 1,45 ^a	14,60 \pm 1,21 ^a	1993 \pm 77 ^a
HOVXAI	1,86 \pm 0,08 ^a	1,42 \pm 0,06 ^a	26,60 \pm 2,14 ^a	12,59 \pm 0,91 ^a	1831 \pm 98 ^a
MC	2,32 \pm 0,09 ^b	1,43 \pm 0,10 ^a	26,50 \pm 1,19 ^a	10,16 \pm 0,56 ^b	2515 \pm 152 ^b
MAI	2,27 \pm 0,09 ^b	1,98 \pm 0,08 ^b #	30,50 \pm 1,91 ^a	14,69 \pm 0,95 ^a #	1749 \pm 305 ^a #

diferencia significativa en ratas macho tratadas con AI respecto a sus controles para p < 0,05

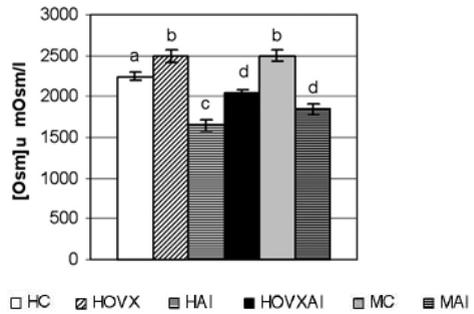
Figura 1: Capacidad para concentrar la orina en respuesta a DDAVP en ratas hembras intactas y ovariectomizadas, y machos con y sin tratamiento prolongado con lactato de aluminio.

Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 6

[Osm]u: osmolaridad urinaria mOsm/l. DDAVP: 1-deamino-[8-D-arginina]-vasopresina

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con Al; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas tratadas con Al; (MC) machos control ;(MAI) machos tratados con Al.

Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes para $p < 0.05$



entre los animales tratados con Al y sus controles respectivos. La función tubular estimada a través de las excreciones fraccionales de agua y sodio muestran que el Al no las modifica en las condiciones del experimento. Las HOVX con y sin tratamiento presentan una menor EF% H₂O, similar a la de los machos. La EF% Na es inferior en los grupos de los machos respecto a los de las hembras. No hay diferencias significativas en la osmolaridad urinaria entre los distintos grupos.

Efectos de la administración crónica de Al sobre la función renal usando técnicas de clearance.

Como se muestra en la (tabla 4) la VFG y el FPRC fueron significativamente mas altas en los machos que en las hembras pero no se observaron diferencias significativas

Tabla 4: Parámetros de la función renal al completar 12 semanas de tratamiento en los distintos grupos obtenidos por técnicas de clearance. Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 5. VFG: velocidad de filtrado glomerular. FPRC: flujo plasmático renal cortical. [Osm]u : osmolaridad urinaria. EF% H₂O: excreción fraccional de agua. EF% Na: excreción fraccional de sodio.

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con Al; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas y tratadas con Al; (MC) machos control; (MAI) machos tratados con Al. Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes para $p < 0.05$

	VFG ml/min100 g	FPRC ml/min 100 g	[Osm]u mOsm/l	EF% H ₂ O	EF% Na
HC	0,65 \pm 0,04 ^a	2,16 \pm 0,16 ^a	1580 \pm 113 ^a	0,48 \pm 0,03 ^b	0,44 \pm 0,05 ^b
HAI	0,56 \pm 0,03 ^a	2,06 \pm 0,12 ^a	1460 \pm 118 ^a	0,54 \pm 0,06 ^b	0,54 \pm 0,06 ^b
HOVX	0,51 \pm 0,03 ^a	1,88 \pm 0,17 ^a	1488 \pm 125 ^a	0,37 \pm 0,03 ^a	0,37 \pm 0,04 ^b
HOVXAI	0,63 \pm 0,04 ^a	1,93 \pm 0,12 ^a	1849 \pm 119 ^a	0,38 \pm 0,02 ^a	0,42 \pm 0,09 ^b
MC	0,81 \pm 0,02 ^b	3,29 \pm 0,17 ^b	1729 \pm 92 ^a	0,37 \pm 0,04 ^a	0,20 \pm 0,03 ^a
MAI	0,80 \pm 0,02 ^b	3,13 \pm 0,13 ^b	1865 \pm 113 ^a	0,36 \pm 0,04 ^a	0,33 \pm 0,04 ^a

Efectos de la administración crónica de AI sobre las concentraciones séricas de Aldosterona, Na⁺, K⁺, osmolaridad y sobre la actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa y GGT en membranas plasmáticas totales

No se observaron variaciones entre grupos en las concentraciones de Na⁺, K⁺, ni en la osmolaridad séricas (datos no mostrados).

En la figura 2 a se pueden observar los cambios en la concentración de aldosterona sérica donde se destaca el aumento significativo inducido por el AI tanto en las ratas machos como en las hembras intactas y OVX. En 2b comprobamos que el incremento indicado previamente sólo va acompañado por aumento de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en el grupo MAI. Por otra parte 2c muestra que el AI reduce la actividad de GGT, parámetro que refleja la integridad del ribete en cepillo del túbulo contorneado proximal, en todos los grupos tratados con AI.

Estudios bioquímicos en tejido renal

Los resultados del contenido de GSH y el grado de LPO en tejido renal se muestran en la figura 3 a y b. El AI induce un aumento en los niveles de LPO que va acompañado de una reducción del contenido de GSH, solo en los machos. En las hembras solo se observa un aumento del contenido de GSH en el grupo OVX.

En la figura 4 se pueden observar las actividades enzimáticas de los sistemas antioxidativos. Respecto a la actividad de GPx (a) en las hembras tanto la OvX como el AI reducen la actividad, sin embargo los efectos no son aditivos. En los machos existe una reducción importante de la actividad por efecto del AI. La actividad de la GR (b) es mayor en los machos que en las hembras, pero en ninguno de los grupos resultó afectada por el AI. La catalasa (c) aumenta por la ovariectomía y disminuye en los grupos tratados con AI. Se observó una diferencia sexual en la actividad de esta enzima.

Figura 2: Efectos de la administración crónica de AI sobre las concentraciones séricas de Aldosterona y sobre la actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa y GGT en membranas plasmáticas totales, en ratas hembras intactas, con OVX y machos. Los datos se expresan como la media ± ESM. Cada grupo n = 6 / GGT: Gamma glutamil transferasa

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con AI; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas y tratadas con AI; (MC) machos control; (MAI) machos tratados con AI.

Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes para p < 0.05

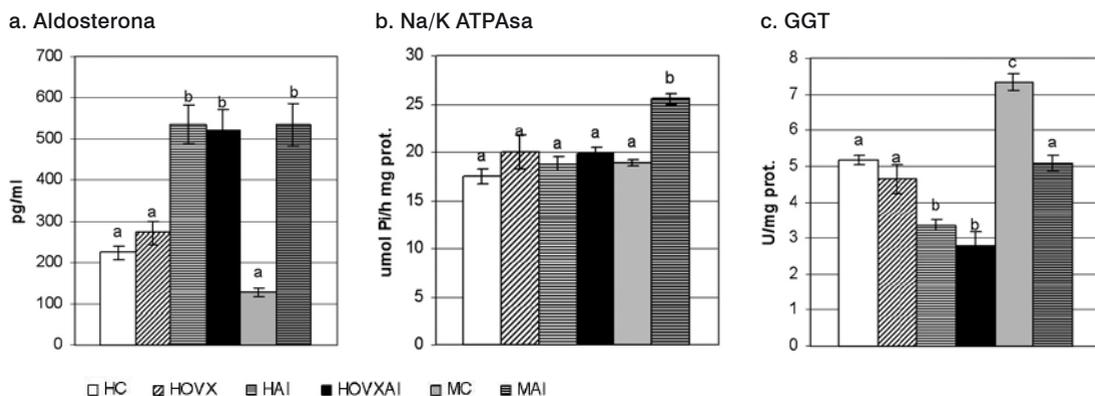


Figura 3: Efectos de la intoxicación crónica con Al sobre el grado de lipoperoxidación y los niveles de GSH en ratas hembras intactas, con OVX y machos.

Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 6

LPO: lipoperoxidación nmol MDA/g tejido húmedo. / GSH: glutatión μ mol/ g tejido húmedo.

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con Al; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas y tratadas con Al; (MC) machos control (MAI) machos tratados con Al.

Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes para $p < 0.05$

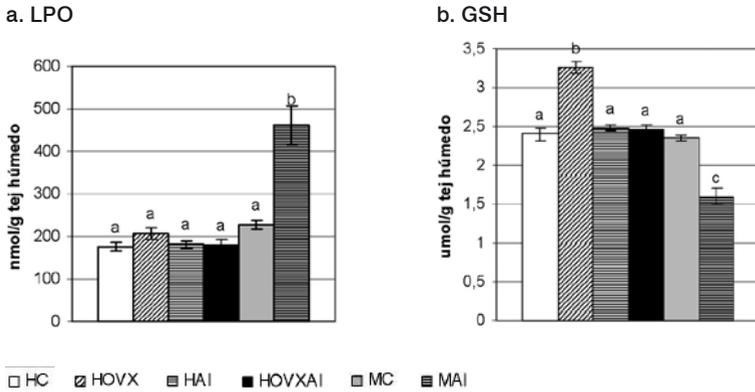


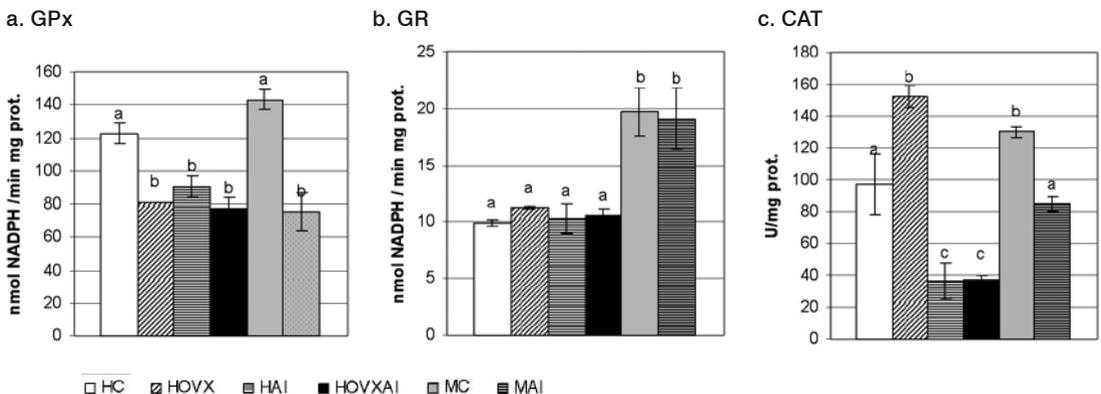
Figura 4: Efectos de la intoxicación crónica con Al sobre la actividad de las enzimas tisulares GPx, GR y Catalasa en ratas hembras intactas, con OVX y machos.

Los datos se expresan como la media \pm ESM. Cada grupo n = 6

GPx: glutatión peroxidasa nmol NADPH/min. mg prot. / GR: glutatión reductasa nmol NADPH/min. mg prot. / CAT: catalasa U/mg prot

Grupos: (HC) hembras intactas; (HOVX) hembras con ovariectomía; (HAI) hembras tratadas con Al; (HOVXAI) hembras ovariectomizadas y tratadas con Al; (MC) machos control (MAI), machos tratados con Al.

Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes para $p < 0.05$



Discusión

En trabajos realizados previamente con ratas machos, demostramos que la administración crónica de AI por exposición parental induce alteraciones en la función tubular tales como un aumento de la reabsorción tubular de fosfato, con incremento en la velocidad máxima aparente sin cambios en la afinidad aparente (14), así como una reducción en la velocidad máxima aparente en el sistema de transporte de aniones orgánicos (15). Asimismo comprobamos alteraciones en los balances de agua y sodio, y disminución en la capacidad de concentración de la orina, efecto este último vinculado a una reducción en la síntesis de AQP2 (17). También observamos que el AI promueve el estrés oxidativo con aumento de LPO, disminución de GSH y reducción de las enzimas antioxidantes GPx y CAT (15). Los efectos previos no estuvieron acompañados de modificaciones en la VFG ni en el FPRC, aunque existió acumulación del catión en tejido renal (14,15, 16,17).

El presente trabajo fue realizado para comprobar si existen diferencias ligadas al sexo en los efectos del AI sobre la función renal. Como diversos estudios han enfatizado el efecto beneficioso de los estrógenos en las diferencias de género, se trabajó además con ratas sometidas a ovariectomía bilateral. Las ratas tratadas crónicamente con AI no mostraron modificaciones en la ingesta de alimento y agua, ni en su peso corporal salvo las vinculadas al sexo, por lo que consideramos que los cambios renales observados deben estar asociados al catión acumulado en tejido renal.

Una diferencia de género fue observada tanto en la VFG como en el FPRC con valores más reducidos en las hembras. Esto coincide con los hallazgos de otros estu-

dios (29, 30, 31). El tratamiento con AI no afectó dichos parámetros en los grupos estudiados.

Los estudios de balance también revelaron diferencias de género. Los machos ingirieron más sodio que las hembras, sin que se observaran cambios en la ingesta de agua ni en la excreción de sodio. No obstante la diuresis fue menor en los machos y con un incremento en la osmolaridad. Estudios en animales demuestran una diferencia sexual en la acción de la vasopresina, donde el riñón de los machos exhibe mayor número de receptores V2 y es más sensible a la AVP que el de las hembras (32, 33). Debemos destacar que en nuestras condiciones de balance no observamos diferencias significativas en la osmolaridad de la orina entre hembras intactas y ovariectomizadas. No obstante la EF% agua en los experimentos de clearance resultó disminuida en los grupos OVX y OVXAI respecto a sus controles respectivos, lo que indica que en situación de infusión de solución salina se pondría de manifiesto la ausencia del efecto del estradiol sobre el riñón (34). La EF% Na resultó mayor en las hembras que en los machos, coincidiendo con los estudios de balance donde a menor ingesta de Na, las hembras excretan diariamente igual cantidad que los machos, siendo evidente una mayor retención de Na por parte de estos últimos.

Asimismo comprobamos una diferencia de género en las pruebas de concentración con DDAVP. La respuesta a AVP es menor en hembras que en machos, y esta diferencia desaparece en el grupo con OVX que resulta similar a la de los machos lo que demostraría la acción del E2 sobre la capacidad de concentrar la orina por el riñón. (32, 33, 34, 35).

En este aspecto comprobamos en los estudios de balance que el AI aumenta la

diuresis y reduce la habilidad para excretar una orina concentrada solo en las ratas machos. No obstante la respuesta a DDAVP fue similar en hembras intactas y machos comparados con sus controles respectivos y ligeramente menor en las hembras OVX. La reducción en la osmolaridad de la orina observada en respuesta a la administración de DDAVP en todos los grupos tratados con Al, sugiere que el mismo podría impedir la respuesta de los tubos colectores a la presencia de AVP. En trabajos previos hemos comprobado en ratas machos que el Al induce una regulación hacia abajo de AQP-2 (Aquaporina-2) en las membranas plasmáticas y en vesículas intracelulares que podrían explicar el manejo alterado del agua, efecto acompañado de una disminución en la excreción de AMPc nefrogénico (17).

Si bien no se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas de Na^+ , K^+ y en la osmolaridad sérica en los diferentes grupos, en los tres tratados con Al se comprobó un aumento en la concentración sérica de Aldosterona. Esto fue acompañado solo en los machos de un aumento de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas plasmáticas totales. No obstante estos cambios, en este grupo aumentó la excreción renal de Na. Es conocido que entre los efectos de la Aldosterona en túbulos renales se encuentran el aumento de la actividad de Na^+/K^+ ATPasa y de la reabsorción de Na. (36). En las hembras intactas y OVX tratadas con Al el aumento de Aldosterona permite mantener el balance de Na. Esto no es observado en los machos donde pese a los incrementos mencionados sigue existiendo un aumento en la excreción de sodio. Una posible explicación podría ser la alteración de canales de sodio o transportadores inducidos por el Al donde podría existir una diferencia de género. Suwalsky y col

(37) reportaron que el Al produce alteraciones en el transporte de sodio en la piel aislada de sapo. Es importante destacar que diferentes especies de Al, orgánicas e inorgánicas, producen alteraciones fisiológicas variadas y de distinta magnitud, ya que la especiación química estaría condicionando tanto su biodisponibilidad como su posible mecanismo de acción (37). Es así que hay trabajos que muestran una reducción en la actividad de Na^+/K^+ ATPasa renal en ratas tratadas con AlCl_3 por vía oral (38).

El Al reduce, tanto en hembras como en machos, la actividad de GGT marcador del ribete en cepillo de la membrana luminal de los túbulos proximales. Se han comunicado efectos citotóxicos del Al en riñón usando microscopia de luz y electrónica. Estos resultados indican la existencia de túbulos proximales dilatados con pérdida de microvellosidades, atrofia de algunos túbulos, fibrosis intersticial y presencia de esclerosis parcial en algunos glomérulos (39).

Hemos comprobado una diferencia de género en la actividad de las enzimas catalasa y glutation reductasa a nivel renal, así como que la OVX reduce la actividad de GPx e incrementa la actividad de CAT, cambios que van acompañados con un aumento de GSH. La reducción de GPx, también observada por otros autores a nivel hepático (40) podría ser el resultado de un mecanismo de compensación ante la ausencia de los estrógenos que como está reconocido inducen actividad antioxidante tanto in vivo como in vitro (3,41).

En las ratas macho el Al induce aumento de la LPO acompañada de una reducción de los niveles de GSH. Simultáneamente existe una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y catalasa, sin cambios en GR. Si bien el Al por presentar un número de oxidación fijo no par-

ticiparía directamente en las reacciones de óxido/reducción, puede actuar como agente pro-oxidante (18). La toxicidad del Al puede estar mediada además, por su acción inhibitoria sobre la actividad de las enzimas GPx y CAT, que llevan a la acumulación de compuestos intermediarios tóxicos tales como el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos.

El Al fue incapaz de inducir un aumento en las especies oxígeno reactivas, tanto en hembras controles como en ovariectomizadas. Tampoco se observaron cambios en el contenido de GSH, pero existió una reducción del mismo en las ratas OVX, respecto a sus controles. Por otra parte, el Al disminuyó la actividad de GPx en hembras controles y OVX. Sin embargo en este último grupo no se pudo comprobar un efecto aditivo de la ovariectomía y el Al. Asimismo se observó un pronunciado descenso en la actividad de CAT por acción del Al.

Si bien el efecto del Al sobre CAT podría ser directo, no hay que descartar la posible inhibición de la actividad de la enzima ante el reemplazo del Fe en su sitio activo por el Al, ya que los radios iónicos de ambos cationes son similares (42).

La resistencia para inducir LPO por presencia del Al a nivel renal, observada tanto en hembras intactas como en OVX, podría ser debida en parte a diferencias existentes en la velocidad de generación de especies oxígeno reactivas que en principio sería independiente de la presencia de estrógenos. Esto llevaría a pensar que otros factores podrían contribuir a la diferencia de género. Si bien muchos estudios han enfatizado el efecto beneficioso de los estrógenos en las diferencias de género observadas en injurias renales, hay trabajos que muestran que las hormonas sexuales masculinas podrían ser responsables de las alteraciones obser-

vadas en los machos (43-44). Este aspecto se está estudiando actualmente.

Podemos concluir que Al puede inducir sobre el tejido renal de ratas machos importantes modificaciones en el estado oxidativo, mientras que en las hembras existiría cierta resistencia a pesar del niveles de estradiol sérico no detectable.

Los resultados estarían mostrando además una menor susceptibilidad a la injuria por Al, en lo que respecta al manejo del agua y sodio por las ratas hembras y esto sería independiente de las hormonas estrogénicas. La disminución en la habilidad para concentrar la orina frente a DDAVP, así como el aumento en la concentración de aldosterona observada en hembras serían efectos independientes de las hormonas sexuales femeninas.

Agradecimientos

Este trabajo se enmarcó dentro de un proyecto CAI+D, subsidiado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral.

Bibliografía

1. United States Renal Data System. USRDS 1997 Annual Data Report. Bethesda, MD National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease 1997.
2. Silbiger, S. and Neugarten, J. 1995. The impact of gender in the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* **25**: 515-533.
3. Dubey, R.K. and Jackson, E.K. 2001. Estrogen-induced cardio-renal protection: potential cellular, biochemical and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* **280**: F 365-F 388.
4. Baylis C. 1994. Age-dependent glomerular damage in the rat. Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a

- primary risk factor. *J Clin Invest.* **94**:1823-1829.
- 5.** Davidoff, M.A.; Caffier, H.; Schiebler, TH. 1980. Steroid hormone binding receptors in the rat kidney. *Histochemistry.* **69**: 39-48.
- 6.** Borrás, C.; Sastre, J.; García-Sala, D.; Lloret, A.; Pallardo, F.V.; Vina J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* **34**: 546-552.
- 7.** Ruiz- Larrea, M.B.; Leal, A.A.; Martín, C.; Martínez, R.; Lacort, M. 1997. Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol.* **53**: 225-229.
- 8.** Actis-Goretta, L.; Carrasquedo, F.; Fraga, C.G. 2004. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta.* **349**: 97-103.
- 9.** Yokel, R.A.; McNamara, P.J. 1985. Aluminum bioavailability and disposition in adult and immature rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol.* **77**: 344-352.
- 10.** Burnatowska-Hledin, M.A.; Mayor, G.H.; Low, K. 1985. Renal handling of aluminum in the rat: clearance and micropuncture studies. *Am J Physiol.* **249**: F192-F197.
- 11.** Monteagudo, F.S.E.; Isaacson, L.C.; Wilson, G.; Hickman, R.; Folb, P.I. 1988. Aluminum excretion by the distal tubule of the pig kidney. *Nephron.* **49**: 245-250.
- 12.** Ebina, Y.; Okada, S.; Hamazaki, S.; Midorikawa, O. 1984. Liver, kidney and central nervous system toxicity of aluminum given intraperitoneally to rats: a multiple dose subchronic using aluminum nitriloacetato. *Toxicol Appl Pharmacol.* **75**:211-218.
- 13.** Cacini, W.; Yokel, R.A. 1988. Accumulation of aluminum by rabbit renal cortex. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **59**: 93-105.
- 14.** Mahieu, S.; Calvo, M.L. 1998. Effect of chronic poisoning with aluminum on the renal handling of phosphate in the rat. *Toxicol Lett.* **94**: 47-56.
- 15.** Mahieu, S.; Gionotti, M.; Millén, N.; Elías, 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.
- 16.** Mahieu, S.; Navoni, J.; Millen, N.; Contini, M.; Gonzalez, M.; Elías, M.M. 2004. Effects of Aluminum on Phosphate Metabolism in Rats: a possible interaction with vitamin D3 renal production. *Arch. Toxicol.* **78**:609-616.
- 17.** Mahieu, S.; Millen, N.; Contini, M. del C.; Gonzalez, M.; Molinas, S.; Elias, M.M. 2006. Urinary concentrating mechanism and Aquaporin-2 abundance in rats chronically treated with aluminum lactate. *Toxicology.* **223** (3):209-218.
- 18.** Exley, C. 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic Biol Med.* **13**: 79-81.
- 19.** Lawrence, R.A. and Burk R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* **71**: 952-958.
- 20.** Horn . Glutathione reductase. In *Methods of Enzymatic Analysis* edited by Bergmeyer, H.U. Weinheim. Germany. Verlag Chemie. 1982.
- 21.** Aebi, H.E. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis* edited by Bergmeyer, H.U. Weinheim. Germany. Verlag Chemie. 1982.
- 22.** Ellman, G.L. 1959 Tissue sulphhydryls group. *Arch Biochem Biophys.* **82**: 70-73.
- 23.** Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* **95**: 351-357.
- 24.** Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265-275.
- 25.** Koshier, F.J.; Stokols, M.F.; Goldinger, J.M.; Acara, M., Hong, S.K. 1980 Effect of DIDS on renal transport. *Am J Physiol.* **238**: F99-F106.
- 26.** Summer, J.B. 1944. A method for colorimetric determination of phosphorus. *Science.* **100**: 413-415.
- 27.** Roe, H.H.; Epstein, J.H.; Goldstein, N.P

- .1949. A photometric method for determination of inulin in plasma and urine. *J Biol Chem.* **178**: 839-845.
- 28.** Waugh, W.H.; Beall, P.T. 1974. Simplified of para-aminohippuric acid and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int* **5**: 429-436.
- 29.** Cerrutti, J.; Quaglia, N.; Torres A. 2001. Characterization of mechanisms involved in the gender differences in p-aminohippurate renal elimination in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 805-813.
- 30.** Munger, K. and Baylis, C. 1988. Sex differences in renal hemodynamics in rats. *Am.J.Physiol.* **254**:F223-F231.
- 31.** Remuzzi, A.; Puntorieri, S.; Mazzoleni, A.; Remuzzi, G.1988. Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich Wistar rats. *Kidney Int.* **34**:481-486.
- 32.** Wang, Y.X.; Crofton, J.T.; Share, I. 1997. Sex differences in the cardiovascular and renal actions of vasopressin in conscious rats. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol* **272**: R370-R376.
- 33.** Wang, Y.X.; Edwards, R.M.; Nambi, P.; Stack, E.J.; Pullen, M.; Share, I. Crofton, J.T.; Brooks, D.P.1993. Sex difference in the antidiuretic activity of vasopressin in the rat. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **265**: R284-R290.
- 34.** Wang, Y.X.; Crofton, J.T.; Liu, H.; Soto, K.; Brooks, D.P.; Share, I. 1995. Estradiol attenuates the antidiuretic action of vasopressin in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **268**: R951-R957.
- 35.** Wang, Y.X.; Crofton, J.T.; Miller, J., Sigman, C.J.; Liu, H.; Huber, J.M.; Brooks, D.P.; Share, I. 1996. Sex difference in urinary concentrating ability of rats with water deprivation. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **270**: R550-R551.
- 36.** Good, D.W. 2007. Non genomic actions of aldosterone on the renal tubule. *Hypertensión.* **49**: 728-739.
- 37.** Suwalsky, M.; Norris, B.; Kiss, T.; Zatta, P. 2002. Effects of Al (III) speciation on cell membranes and molecular models. *Coor. Chem. Rev.* **228**: 285-295.
- 38.** Silva, V.; Duarte, A.I.; Rego, A.C.; Oliveira, C.R., Gonçalves, P.P. 2005. Effect of chronic exposure to aluminium on isoform expression and activity of rat (Na/K) ATPase. *Toxicol Sci* **88** (2): 485-494.
- 39.** Somova, L.I.; Missankov, A.; Khan, M.S. 1997. Chronic aluminium intoxication in rats: dose-dependent morphological changes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **19**: 599-604.
- 40.** Kireev, R.A.; Tresguerres, A.F.; Vara, E.; Ariznavarreta, Tresguerres, J.A. 2007. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. *Biogerontology.* **8**(5):469-482.
- 41.** Schwenke, D.C. 1998. Aging, menopause and free radicals. *Semin Reprod Endocrinol* **16**: 281-308.
- 42.** Macdonald, T.L.; Martin, R.B. 1988. Aluminum ion in biological systems. *Trens Biochem Sci .* **8**: 15-19.
- 43.** Park, K.M.; Kim J.I., Ahn, Y.; Bonventre A.J.; Bonventre, J.V.2004. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J.Biol Chem.* **279**: 52282-52292.
- 44.** Kim, J.; Kil, I.S.; Seok, Y.M; Yang, E.S.; Kim, D.A. Lim, D.G.; Park, J; Bonventre, J.V.;Park, K.W. 2006. Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. *J.Biol Chem.* **281**:20349-20356.