



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

***MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LAS ALTERACIONES DE
LA FUNCIÓN SECRETORA BILIAR INDUCIDOS POR LA
ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ALUMINIO EN RATAS.***

Autor: Bqca. MARCELA AÍDA GONZÁLEZ

Director de Tesis: Dra MARÍA CRISTINA CARRILLO

Co-Director de Tesis: Dr CLAUDIO ADRIÁN BERNAL

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AÑO 2005

***A las personas más importantes de mi vida:
A FERNANDO, FRANCISCO, IGNACIO Y PAULA
A MAMÁ***

AGRADECIMIENTOS

- A mi Familia: Fernando, Francisco, Ignacio, Pauli y Mamá por estar siempre apoyándome en este emprendimiento dándome todo el amor y comprensión.
- A la Dra M. Cristina Carrillo por haberme guiado a través de toda la tesis con su valiosa crítica y su confianza.
- Al Dr. Claudio Bernal por estar siempre presente, por su comprensión y por tener siempre una mano dispuesta a ayudarme.
- Al Dr. Marcelo Roma por darme su ayuda tan valiosa y guiarme en este trabajo aportándome toda su comprensión y conocimientos.
- A Stella Mahieu, María del Carmen Contini y Néstor Millen por su ayuda siempre valiosa, su amistad y compañerismo gracias a lo cual pude llevar adelante el trabajo experimental, todo mi agradecimiento y cariño.
- A Luján Álvarez, Gerardo Pisani y a todos los integrantes del IFISE, por su ayuda y recibimiento siempre cordial logrando que me sintiera como uno de ellos.
- A las chicas de la Cátedra de Bromatología porque al final de este camino me dieron toda su alegría y optimismo.
- A la UNL por haberme permitido a través de la beca que me concedió, facilitar la realización de mi tesis doctoral.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis fueron publicados en Revistas Nacionales e Internacionales y presentados en reuniones Científicas Nacionales e Internacionales que se enumeran a continuación.

PUBLICACIONES

1- "VARIACIONES DE PARÁMETROS DE FUNCIONALIDAD HEPÁTICA POR EFECTO DEL ALUMINIO". Revista FABICIB. ISSN: 0329-5559. **Marcela González**, M.C.Contini, N.Millen, S.Mahieu. Revista de la Facultad de Bioquímica y Cs Biologicas de la Universidad Nacional del Litoral. Vol. 2, pág. 75-82. 1998.

2- "BILE SECRETORY FUNCTION IN RATS CHRONICALLY EXPOSED TO ALUMINUM". **Marcela A. González**, Marcelo Gabriel Roma, Maria del Lujan Alvarez, Claudio A. Bernal, María Cristina Carrillo. Toxicol. Sci., May 2004; 79: 189 - 195.

3- "EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ALUMINIO SOBRE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADOS REGENERANTES".

González Marcela A., Contini María del Carmen, Mahieu Stella, Bernal Claudio. Revista FABICIB. ISSN: 0329-5559. Vol. Pág. 2004

4- "INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS IN THE IMPAIRMENT IN BILIARY SECRETORY FUNCTION INDUCED BY CHRONIC ADMINISTRATION OF ALUMINUM TO RATS". **Marcela A. González**, Maria del Lujan Álvarez, Gerardo Pisan, Claudio Bernal, Marcelo G. Roma, María C. Carrillo. 2005..Enviada a publicar a Toxicol Sci .

5- "ROL DE LA VITAMINA E SOBRE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIGADOS REGENERANTES". **González Marcela A.**, Bernal Claudio, Contini María del Carmen, Mahieu Stella, Carrillo MC. Revista FABICIB. Año 2005

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS.

- Expositora del Trabajo: "Transporte hepático de Bromosulffofoftaleína en ratas parcialmente hepatectomizadas intoxicadas con Aluminio" Autores: **González, Marcela**; Bernal, C.; Contini, María del Carmen; Carrillo, M. XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de investigación Clínica. Mar del Plata. Argentina. 14 al 17 de Noviembre 2001.

- Expositora del Trabajo: "Efectos del aluminio sobre la función de hígados regenerantes". Autores: **González, M.**; Bernal, C.; Contini, María del Carmen;

Carrillo, M. XXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Argentina. 26-27/11 /2001

- Expositora del Trabajo: "Acción del aluminio sobre la secreción biliar en ratas parcialmente hepatectomizadas" Autores: **González, Marcela**; Contini, María del Carmen; Bernal, C.; Carrillo, M. V Congreso y XXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Argentina. 4-5/12 /2002.

- Expositora del trabajo: "Efectos de la exposición crónica al aluminio en hígados regenerantes. estudio de la secreción biliar", **González Marcela**, Contini María del Carmen, Bernal Claudio. Congreso Alimentación Siglo XXI organizado por el Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Mendoza. Argentina.2-4/10/2003.

- Expositora del trabajo: "Exposición crónica al aluminio sobre el stress oxidativo en hígado". **González Marcela**, Contini María del Carmen, Bernal Claudio. Congreso Alimentación Siglo XXI organizado por el Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Mendoza. Argentina.2-4/10/2003.

- Expositora del Trabajo: " Efecto de la intoxicación crónica con aluminio (Al) sobre la expresión y la actividad del transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos Mrp2" **González Marcela**, Roma Marcelo, Alvarez Luján , Carrillo MC. 48º Reunión anual de la Sociedad Argentina de investigación

Clínica (SAIC) / 51° Reunión anual Sociedad de inmunología (SAI). Mar del Plata. 19-22 noviembre 2003.

- Expositora del Trabajo: "Efecto del aluminio sobre el estrés oxidativo de hígados regenerantes ". **González Marcela**, Contini MC, Mahieu Stella, Millen Nestor, Bernal Claudio, Carrillo MC. Presentado en la Sociedad de Biología de Rosario. 4-5 diciembre 2003.

- Expositora del trabajo: "Rol del estrés oxidativo ocasionado por el aluminio en la función transportadora hepática. Efectos de la vitamina E". **González Marcela**, Roma Marcelo, Álvarez Luján ;Bernal Claudio; Mahieu Stella, Contini María del Carmen Carrillo María Cristina. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas 2004. Mar del Plata 16-20 Noviembre 2004.

- Expositora del trabajo: "Alteraciones ocasionadas por el aluminio en el flujo biliar independiente de sales biliares (FBISB) en ratas". XXVII REUNIÓN ANUAL DE CASLAN. JORNADAS DE NUTRICIÓN Y SALUD. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Santa Fe. 11-12-13 Noviembre 2004. **González Marcela**, Mahieu Stella, Contini M del Carmen, Carrillo M. Cristina, Bernal Claudio.

- Expositora del trabajo: "Transporte hepático de rosa de bengala en ratas parcialmente hepatectomizadas tratadas con aluminio (Al)". XXVII REUNIÓN ANUAL DE CASLAN. JORNADAS DE NUTRICIÓN Y SALUD. Facultad de

Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Santa Fe. 11-12-13 Noviembre 2004.

González Marcela, Mahieu Stella, Contini M del Carmen, Carrillo M. Cristina, Bernal Claudio.

- Expositora en el SIXTH KEELE MEETING ON ALUMINIUM, organizado por la Universidad de Keele, Inglaterra y realizado en la universidad de aveiro, Portugal entre el 26 de febrero y 2 de marzo del 2005. Trabajo presentado en forma de póster y presentación oral "EFFECTS OF VITAMIN E ON BILIARY SECRETORY FUNCTION IN RATS CHRONICALLY INTOXICATED WITH ALUMINIUM". **González Marcela**, Roma Marcelo, Bernal Claudio, Mahieu Stella, Contini Maria del Carmen, Carrillo M. Cristina.

- Expositora del trabajo: "EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE EL TRANSPORTE DE ANIONES ORGÁNICOS EN RATAS CON HEPATECTOMIA PARCIAL" en III Encuentro bioquímico del litoral VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas –UNL 16, 17 y 18 de junio de 2005. **González, Marcela A.**; Contini María del Carmen, Bernal Claudio, Mahieu Stella; Carrillo María Cristina.

- Expositora del trabajo: "VITAMINA E: PREVENCIÓN DE ALTERACIONES EN UN MODELO DE INJURIA HEPÁTICA" en XXVIII reunión anual de CASLAN y XXII Jornadas Regionales de Bromatología y Nutrición de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición Capítulo Argentino. **González Marcela**, Contini M del C, Mahieu Stella, Bernal Claudio, Carrillo M. Cristina.

RESÚMENES PUBLICADOS

- "Hepatic transport of bromosulfoftalein in rats partially hepatectomized intoxicated with aluminium". **González Marcela**, Contini María el Carmen, Bernal Claudio, Carrillo María Cristina. Biocell. ISSN: 0.327-9545. pag 203, vol 25, N°2. Mendoza 2001.

- " Effects of aluminium on the function of regenerated liver". **González Marcela**, Contini María el Carmen, Bernal Claudio, Carrillo María Cristina. Biocell. ISSN: 0.327-9545. 2002. 26 (1) 125.

- "Effects of aluminum on the function of regeneranted livers". **González Marcela**, Contini María del Carmen, Bernal Claudio, Carrillo MC. Biocell. ISSN: 0.327-9545. 2003. 27 (2) 239

- " Effect of the aluminium on the oxidative stress of livers regenerated" . **González Marcela**, Contini María del Carmen, Mahieu Stella, Bernal Claudio, Carrillo MC. Biocell 2004. ISSN: 0.327-9545. 2004.

- " Effect of the aluminum on the oxidative stress on regenerated livers". **González, Marcela A.**; ¹Mahieu Stella; ²Bernal Claudio; ¹Contini María del Carmen; ¹Catalín Astrid; ¹Millen Nestor; ³Carrillo María Cristina..Biocell 2004. ISSN: 0.327-9545. 2004.

- "Preventive effect of vitamin e on the oxidative stress caused by aluminum (Al) in rats". **González, Marcela A.**; ¹Contini María del Carmen; ¹Mahieu Stella; ¹Bernal Claudio; ²Carrillo María Cristina. Biocell 2005. ISSN: 0.327-9545

PREMIOS NACIONALES

-SEGUNDO PREMIO por el trabajo " EXPOSICIÓN CRONICA AL ALUMINIO SOBRE EL STRESS OXIDATIVO EN HÍGADO" González Marcela, Contini M del C, Bernal Claudio, presentado en el CONGRESO DE ALIMENTACIÓN EN EL SIGLO XXI, llevado a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo del 2-4 de octubre 2003. Mendoza. Argentina. Organizado por la Asociación Latinoamericana de Nutrición.

- PRIMER PREMIO por el trabajo "VITAMINA E:PREVENCIÓN DE ALTERACIONES EN UN MODELO DE INJURIA HEPÁTICA" González Marcela, Contini M del C, Mahieu Stella, Bernal Claudio, Carrillo M. Cristina. Obtenido en la XXVIII reunión anual de CASLAN y XXII Jornadas Regionales de Bromatología y Nutrición de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición Capitulo Argentino.

PREMIOS INTERNACIONALES

-Adquisición de una de las cinco becas otorgadas por la Universidad de Keele, Inglaterra, para la Exposición en el Sixth Keele Meeting on Aluminium, 2005 realizado en la Universidad de Aveiro, Portugal entre el 26 de Febrero y 2 de Marzo del 2005. Trabajo presentado en forma de poster y presentación oral :

“EFFECTS OF VITAMIN E ON BILIARY SECRETORY FUNCTION IN RATS
CHRONICALLY INTOXICATED WITH ALUMINIUM”.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	4
1.1 EL ALUMINIO EN LOS ORGANISMOS VIVOS	4
1.1.1 Exposición al Aluminio	4
1.1.2 Toxicocinética del Aluminio	7
1.1.3 Especiación del catión Aluminio en soluciones acuosas y líquidos biológicos	9
A: Complejos con ligandos inorgánicos	
B: Complejos con ligandos orgánicos del plasma	
1.1.4 Mecanismo de acción del Aluminio sobre las células	13
1.1.5 Patologías relacionadas con el Aluminio	15
1.1.6 Efectos del Aluminio sobre el hígado	16
1.2 EL HÍGADO COMO ÓRGANO EXCRETOR	18
1.2.1 Mecanismos de formación de la bilis	18
1.2.2 Fisiología de la secreción biliar	20
1.2.3 Sistemas de transporte en el hepatocito	24
1.2.3.1 Transporte basolateral	26
1.2.3.1 Conjugación y fijación intracelular	28
1.2.3.3 Transporte canalicular	29
1.2.4 Posibles mecanismos moleculares que intervienen en el	32

desarrollo de hepatotoxicidad	
1.3 EVENTOS OXIDATIVOS	35
1.3.1 Generalidades	35
1.3.2 Glutathion	38
1.3.3 Vitamina E	39
1.4 MUERTE CELULAR	40
1.5.1 Generalidades sobre apoptosis y necrosis	40
1.5.2 Apoptosis inducida por metales	41
CAPITULO 2: OBJETIVOS	44
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	46
3.1 ANIMALES	47
3.2 ADMINISTRACIÓN DEL ALUMINIO	47
3.3 ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA E	49
3.4 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	50
3.5 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES FUNCIONALES	51
3.5.1 Estudios de la secreción biliar	51
3.5.2 Estimación de parámetros farmacocinéticos de transporte hepático	52
3.5.3 Estimación del flujo biliar independiente de sales biliares (FBISB)	54
3.5.4 Actividad transportadora de Mrp2	54

3.6 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	55
3.6.1 Determinación de aluminio en suero y tejidos	55
3.6.2 Determinación de parámetros bioquímicos marcadores de daño hepático	56
3.6.3 Determinación de sales biliares totales	56
3.6.4 Determinación de Glutation total (GSH)	57
3.6.5 Determinación de HCO ₃ ⁻	57
3.6.6 Determinación de Bromosulfoftaleína (BSF)	57
3.6.7 Determinación de Rosa de Bengala (RB)	58
3.6.8 Determinación de proteínas totales	58
3.6.9 Determinación de colesterol total	58
3.6.10 Determinación de fosfolípidos	58
3.6.11 Niveles celulares de proteínas de transporte: Mrp2	59
3.6.12 Evaluación del metabolismo oxidativo en el tejido hepático	60
3.6.13 Determinación de Glutation reducido	60
3.6.14 Determinación del grado de lipoperoxidación (LPO)	61
3.6.15 Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes	61
3.6.16 Determinación de la actividad de la enzima Glutation-S transferasa (GST)	62
3.7 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	63
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65

4.1 EFECTO DE UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA A ALUMINIO SOBRE LA FUNCIÓN HEPÁTICA	66
4.1.1 ESTUDIO DE DISTINTAS DOSIS DE ALUMINIO EXPERIMENTALES	66
4.1.1.1 Efecto del Al sobre el peso corporal	66
4.1.1.2 Parámetros séricos de alteración hepática	67
4.1.1.3 Función secretora biliar	68
4.1.2 ACUMULACIÓN TISULAR DE ALUMINIO	68
4.1.3 FUNCIÓN SECRETORA BILIAR	71
4.1.3.1 Alteraciones inducidas por el aluminio sobre la velocidad de excreción de componentes biliares	71
4.1.3.2 Alteraciones inducidas por el aluminio en el flujo biliar independiente de sales biliares (FBISB).	73
4.1.3.3 Efecto del aluminio sobre el transporte hepático del anión orgánico Bromosulfoftaleína (BSF).	76
4.1.3.4 Efecto del aluminio sobre la actividad de la Glutation S-transferasa (GST).	78
4.1.3.5 Efecto del aluminio sobre la excreción de BSF	80
4.1.3.6 Efecto del aluminio sobre el transporte hepático del anión orgánico RB	81
4.1.3.7 Efecto del aluminio sobre los niveles celulares y actividad del transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico: Mrp2	83

4.1.4 EFECTOS DEL AL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO HEPÁTICO	86
4.1.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	90
4.1.5.1 Índice de Apoptosis y Necrosis	90
4.2 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL ALUMINIO	95
4.2.1 EFECTO DE LA VITAMINA E SOBRE EL CONTENIDO DE AL EN PLASMA Y TEJIDO HEPÁTICO	95
4.2.2 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE LA SECRECIÓN BILIAR	97
4.2.2.1 Efecto preventivo de la vitamina E sobre el flujo biliar	97
4.2.2.2 Efecto preventivo de la vitamina E sobre el transporte hepático de aniones orgánicos colefilicos	99
4.2.2.3 Efecto preventivo de la vitamina E sobre los niveles celulares y la actividad transportadora de Mrp2	100
4.2.3 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	102
4.2.4 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE PARÁMETROS DE ANÁLISIS HISTOLÓGICOS	105

CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS

- ABC transportadores con casete de unión al ATP
- ABC transportadores con cassette de unión al ATP
- AE intercambiador aniónico independiente de Na⁺
- AI índice apoptótico
- Al aluminio
- ALAT alanina aminotransferasa
- ANOVA análisis de la variancia
- AO aniones orgánicos
- AQP aquaporinas
- ASAT aspartato aminotransferasa
- BSEP/Bsep bomba exportadora de sales biliares
- BSF bromosulfoftaleína
- CAT catalasa
- CDNB cloro 24-dinitrobenceno
- Clp clearance plasmático
- cMoat transportador canalicular multiespecífico de AO
- DNG-SG dinitro-fenilglutination
- DTNB 5,5 ditiobis-2 nitrobenzoico
- FA fosfatasa alcalina
- FB flujo biliar
- FBDSB flujo biliar dependiente de sales biliares

Abreviaturas

- FBISB flujo biliar independiente de sales biliares
- FH fibrosis
- FL fosfolípidos
- GSH glutation forma reducida
- GSH-Px glutation peroxidasa
- GSSG glutation forma oxidada
- GST glutation S-transferasa
- HBAB proteína de unión a sales biliares de alta afinidad
- H-FABP proteína hepática de unión a ácidos grasos
- HN necrosis hepatocelular
- LPO lipoperoxidación
- MDA malonilaldehído
- MDR/Mdr proteínas de resistencia a multidrogas
- MRP/Mrp proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas
- NADPH nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
- NBD número de conductos biliares en areas portales
- NTCP/Ntcp polipéptido cotransportador de Na y taurocolato
- OATP/Oatp polipéptidos transportadores de aniones orgánicos
- OCT/Oct transportadores de cationes orgánicos
- PTI inflamación en tracto portal
- r_{12} constante intrínseca de captación hepática
- r_{21} constante intrínseca de reflujo sinusoidal
- r_3 constante intrínseca de excreción canalicular

Abreviaturas

- RB rosa de bengala
- ROS especies oxígeno reactivas
- SB sales biliares
- Spgp, hermana de la P-glicoproteína
- $T_{1/2} \alpha$ tiempo de vida media fase rápida
- $T_{1/2} \beta$ tiempo de vida media fase lenta
- TBARS sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
- Vd volumen de distribución
- VESB velocidad de excreción de sales biliares
- Vit E vitamina E
- V_{VPF} densidad volumétrica de areas portales.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ALUMINIO EN LOS ORGANISMOS VIVOS

1.1.1. Exposición al Aluminio

El Aluminio (Al) es el tercer elemento más común en la tierra después del oxígeno y del silicio, existiendo primariamente como aluminosilicatos polimorfos en rocas y suelos. El 28 % de la corteza terrestre está constituido por silicio y el 8,2 % por Al. La elevada abundancia relativa de ambos elementos favorece la formación de aluminosilicatos, los cuales, afortunadamente son insolubles (1). De esta manera se alcanza un equilibrio geoquímico natural que reduce la biodisponibilidad del Al (2). Sin embargo, la creciente acidificación del ambiente ha aumentado tanto la solubilización como la conversión de los aluminosilicatos en especies biológicamente activas (3) incrementando la biodisponibilidad de este elemento.

El Al no constituye un elemento esencial para los organismos vivos, ya que no se han descrito mecanismos biológicos que lo involucren con procesos metabólicos que controlen su biodisponibilidad (2). «La biodisponibilidad de una sustancia, es una medida potencial de la misma para interactuar dentro de un sistema biológico y producir una respuesta concomitante de tal sistema» (2).

Por su ubicuidad en el ambiente, la exposición de la población al Al es prácticamente sostenida a lo largo de la vida, y puede dar como resultado una sustancial acumulación corporal del mismo. La exposición tiene su origen en el

uso del Al en medicina, en la industria farmacéutica, en la elaboración de vacunas, en la preparación de formulaciones nutricionales y alimentos, en la manufactura de cosméticos y antitranspirantes, en la fabricación de latas y envoltorios, y a su presencia en el agua de bebida y en el polvo atmosférico (4).

La presencia de Al en el agua de bebida deriva de su fuente natural y de los métodos empleados para la potabilización. La cantidad de Al que permanece en solución en el agua de red depende de la concentración residual, del pH y de otras sustancias. Sin embargo, en comparación con otras, esta fuente de exposición representa una pequeña proporción de la ingesta diaria de Al. La presencia de ciertas especies solubles de Al, de bajo peso molecular químicamente reactivas y más fácilmente absorbibles, sería responsable de la mayor biodisponibilidad del catión en el medio (5).

El contenido de Al en los comestibles es altamente variable (6,7) por su empleo generalizado no solo en la manufactura sino también durante el almacenaje en contenedores como latas y envoltorios. El Al es adicionado como aditivo a alimentos derivados de cereales, quesos, durante el procesamiento industrial de conservas de frutas y son componentes habituales de polvos de hornear, aditivos alimentarios y conservadores. Otra fuente está constituida por el uso de utensilios de cocina de aluminio para la preparación y/o conservación de las comidas.

Existen fuentes iatrogénicas que están constituidas por las vacunas (Al como adyuvante), antiácido (hidróxido de aluminio), ligadores de fosfatos (resinas cíclicas de aluminio), soluciones de hemodiálisis y soluciones o

formulaciones de soporte nutricional especialmente parenterales (7). Además otra vía de incorporación del Al, podría ser a través de la captación dérmica, como es el caso de los antitranspirantes cuya capacidad de absorción depende del compuesto químico constitutivo (8).

Otro aspecto significativo lo constituye el riesgo de exposición ocupacional vinculado al ingreso del metal a través de la piel o por inhalación de polvos, vapores y humos al que se ven sometidos los trabajadores de refinerías, fundiciones, canteras, minas e industrias que trabajan con Al (9).

1.1.2. Toxicocinética del Aluminio

Debido a su insolubilidad, solo una muy pequeña fracción del Al presente en alimentos, agua y medicamentos está disponible para su absorción (0,1 - 1%) por el tracto gastrointestinal (10), siendo la mayor parte eliminada por excreción renal (10,11) y en menor extensión por bilis (11). La baja solubilidad del Al, particularmente como sales de fosfato, asegura que la mayor parte del Al ingerido se excrete por heces (10,11). La administración por vía intravenosa constituye un riesgo potencial de acumulación y toxicidad del Al debido al 100% de biodisponibilidad y a la avidéz del mismo por unirse a la transferrina que previene un rápido clearance.

La vía de ingreso al organismo y el mecanismo de absorción, así como la forma que adquiere el Al sistémico podrían ser determinantes de la subsiguiente distribución del metal. En plasma la mayor parte del Al está unido a la transferrina (89%). Una pequeña fracción está acomplejada al citrato y el

remanente es de esperar que forme complejos con hidróxidos y fosfatos (12). Fracciones proteicas de bajo peso molecular pueden contener transitoriamente formas de Al, por ej. Hidroxialuminosilicatos, constituyendo formas lábiles del catión (13).

Las pequeñas cantidades reabsorbidas por el tracto intestinal pueden representar a lo largo de los años, significativas acumulaciones en cerebro (14,15), hueso (10,11), hígado (11) y otros tejidos, particularmente si su remoción es impedida por el deterioro de la función renal. En condiciones experimentales, y en presencia de una función renal normal se ha demostrado que el Al se acumula en riñón (16-19), estómago, cerebro y hueso (17,19), e hígado (17-19). De hecho hay muy pocos compartimientos en los que el Al no se acumula. Sin embargo, estudios con peces expuestos al Al por períodos de 2 años muestran muy pequeñas captaciones en el cristalino de los ojos comparados con otros órganos (11). La administración crónica de Al además de producir su acumulación en distintos tejidos, es responsable de un aumento del mismo en suero y orina.

Tanto el acúmulo tisular como la excreción renal de Al están condicionadas por las características farmacocinéticas del mismo que determinan una distribución pluricompartimental (comportándose cada tejido como un compartimiento distinto) y su eliminación se da como resultado de un equilibrio entre la fracción absorbida, la fracción distribuida tisularmente y la fracción plasmática.

El cuerpo constituye un sistema verdaderamente dinámico que está lejos de un equilibrio químico y el Al corporal total acumulado está en un continuo

estado de flujo entre los diferentes compartimientos e involucran aquellos mecanismos que influyen en su absorción y excreción. Se debe considerar a los depósitos corporales algo más que la suma de distintas fuentes de Al. Así, el hallazgo de Al en hueso no necesariamente contribuye, por su sola presencia a una enfermedad ósea, si no que puede ser el principal factor que controle la biodisponibilidad del mismo en cerebro. Esto significaría que la comprensión de la toxicidad sistémica del Al debería tener en cuenta no solo las principales fuentes corporales de Al, sino también cuales son los mecanismos involucrados en su liberación, y una vez liberado cuales son las consecuencias de la redistribución del metal (11).

Como fuera descrito anteriormente, el riñón constituye el principal camino para la eliminación de las pequeñas cantidades de Al absorbidas, sin embargo el manejo renal de Al no ha sido completamente establecido. Como no se han descrito mecanismos que remuevan el catión de la transferrina para permitir su excreción renal, y ante el hecho de que el Al se excreta por riñón, es evidente que pequeños ligandos ultrafiltrados juegan un papel importante en la remoción del Al sistémico por dicha vía (4).

1.1.3. Especiación del catión Aluminio en soluciones acuosas y líquidos biológicos

En la mayoría de los sistemas naturales solo una muy pequeña fracción de Al se encuentra como ion acuoso simple Al^{+3} . Así, la absorción, excreción, retención tisular y depósitos estarían dependiendo de las propiedades de los

complejos de Al^{+3} formados con ligandos biológicos (20).

El pH fisiológico del entorno celular de los organismos vivos oscila alrededor de 7,4. La complejidad de la química acuosa del Al^{+3} a pH fisiológico, genera serios problemas interpretativos en los resultados obtenidos, ya que tanto las investigaciones toxicológicas como bioquímicas sobre el Al están inevitablemente influenciadas por la capacidad de hidrólisis de los compuestos del metal en este medio (21). Los conceptos de biodisponibilidad y toxicidad potencial del Al carecen de sentido si no se comprende el comportamiento químico del metal en soluciones acuosas neutras.

Como catión trivalente, el Al^{+3} se une fuertemente a ligandos donantes de oxígeno tales como el citrato y el fosfato. La coordinación química del Al es afectado por la tendencia de los complejos de Al a hidrolizarse y formar especies polinucleares, muchas de las cuales son escasamente solubles.

Independiente de la presencia de otros ligandos, en el sistema acuoso, la hidrólisis de Al^{+3} produce una mezcla compleja de especies mononucleares. A $\text{pH} < 5$ existe en solución como especie hexahidratada $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+3}$ la cual sufre sucesivas deprotonaciones a medida que aumenta el pH. En soluciones neutras precipita $\text{Al}(\text{OH})_3$, el cual se disuelve en medios alcalinos para formar $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ predominante a $\text{pH} > 6.2$. Cuando los valores de pH están comprendidos entre 5 y 6.2 se verifica una mezcla de todas las especies mencionadas (12).

La biodisponibilidad y en consecuencia la toxicidad del Al dependen de la identidad química de la especie reactiva y de la capacidad de los ligandos presentes en el medio, para interferir en la esfera de hidratación del ión

metálico. La especie capaz de reaccionar con ligandos inorgánicos, orgánicos o proteínas en el medio intracelular y extracelular, es el Al libre no hidrolizado, es decir, $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+3}$ o Al^{+3} .

El Aluminio puede encontrarse fisiológicamente formando complejos:

A: con ligandos inorgánicos

B: con ligandos orgánicos del plasma

A. Complejos con ligandos inorgánicos

Las sustancias inorgánicas que pueden influenciar la especiación del Al^{+3} coordinan a través de los átomos de C, N, O, S, F. La formación de complejos mononucleares estables con fosfato, fluoruro, sulfato y silicato, compite con las reacciones de hidrólisis. En soluciones neutras sólo tienen probabilidad de existencia los complejos con fosfato y fluoruro, aunque en el primero predomine la reacción de precipitación (22).

El Al interviene además en la formación de complejos polinucleares mixtos con carbonatos y bicarbonatos en el sistema H-Al-CO₂ (23).

B. Complejos con ligandos orgánicos del plasma

De los ligandos orgánicos con los que el Al puede formar complejos, son de interés aquellos que predominan en sangre: los ácidos policarboxílicos oxálico y cítrico; los monocarboxílicos láctico, acético y propiónico; y las proteínas.

El anión citrato constituye, por su concentración, la molécula pequeña

mas importante capaz de comportarse como potencial ligando del Al^{+3} (12). A pH 7.4 el citrato se halla como trianión y reacciona con el metal no hidrolizado para formar un complejo con carga neta cero, con especies mononucleares que contienen 2 moléculas de ligando (23,12) y especies polinucleares que contienen 3 especies de ligandos (12). El complejo neutro Al-Citrato merece especial interés ya que atraviesa las membranas biológicas con suma facilidad.

El ligando orgánico mas efectivo para el Al^{+3} es la proteína transferrina, que posee dos sitios disponibles para ligar metales. La misma, normalmente tiene entre un 15-55% de su capacidad de unión saturada con el Fe^{+3} , ion por el que tiene gran avidez. El Fe^{+3} se une a la transferrina con mayor afinidad que el Al (24,25) y esto haría prácticamente imposible que el Al competiese efectivamente con el hierro por sus sitios de transporte. La saturación por el Fe de un tercio de la capacidad total de la transferrina, permite que capacidad de unión de dicha proteína del Al sérico sea de $50 \mu\text{mol/l}$, cuyo nivel excede la concentración normal del catión libre en suero (26).

Algunos estudios sugieren que el Al podría unirse débilmente a la albúmina (26) en los sitios del calcio. No obstante, la albúmina parece tener un rol muy pequeño, si alguno, en el transporte de Al en suero (20).

Con la ayuda de sofisticados programas de computación, se realizaron estudios de simulación de la especiación del aluminio en condiciones plasmáticas hipotéticas. Sin embargo, dada la inestabilidad de los complejos de bajo peso molecular del Al con citrato, fosfato e hidróxido, los resultados han sido limitados (20).

La habilidad de diferentes ligandos para solubilizar y transportar el Al^{+3} a

diferentes tejidos, donde se debe producir una reacción de intercambio entre el ligando y grupos funcionales en las moléculas blanco para transferir el Al es muy variable, dependiendo de la especiación. Este es el motivo primario, si no exclusivo, por el cual algunos complejos de Al son mas tóxicos que otros. Los efectos biológicos del Al utilizando compuestos con diferente estabilidad hidrolítica y con diferentes propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas pueden desencadenar efectos biológicos diferentes tanto en sus aspectos cuali como cuantitativos (21).

1.1.4 Mecanismo de acción del aluminio sobre las células

El Al acumulado en los tejidos puede inducir toxicidad, sin embargo, su mecanismo no ha sido aun perfectamente definido y puede diferir de acuerdo a los distintos tejidos y sistemas. El Al está unido a fosfatos fuertemente básicos, como nucleosidos di y trifosfatos. Los grupos fosfatos de cualquier proteína fosforilada, junto a carboxilos u otro fosfato yuxtapuesto constituyen importantes sitios de unión para el Al^{+3} , conduciendo a interferencias en una variedad de procesos metabólicos celulares. Sin embargo dado que su unión con fosfatos no básicos de polímeros de ácidos nucleicos en la célula es débil, el potencial efecto sobre el DNA y RNA es menor (20).

Se ha propuesto que los efectos tóxicos del Al sobre los tejidos pueden explicarse por mecanismos generales de acción, entre los que se destacan: a) disrupción de las membranas celulares, b) alteración del metabolismo mineral, c) daño peroxidativo y d) interacción con la proteína G (27).

El Al podría afectar las membranas celulares por su unión a componentes de la misma, por alteración del funcionamiento de las compuertas de canales iónicos o por aumento de la lipoperoxidación (LPO). La unión del Al^{+3} a moléculas de fosfolípidos en la membrana celular puede alterar las propiedades fisicoquímicas de las mismas modificando su composición y funcionamiento. Esto puede producir cambios en la homeostasis del calcio intracelular provocando diversos signos de toxicidad celular (27)

Los efectos reconocidos de intoxicación crónica de Al sobre metales esenciales incluyen al hierro (28,29), cobre y zinc (30), manganeso (31) y al magnesio (32).

Si bien el Al^{+3} tiene un número de oxidación fijo y no puede participar directamente en reacciones de óxido / reducción, la peroxidación lipídica está aumentada en presencia del mismo, haciendo a las células más susceptibles al ataque de radicales libres (33). Los mecanismos por los cuales induce peroxidación son desconocidos, aunque ellos pueden involucrar un metabolismo alterado del Fe, como resultado de una mayor disponibilidad intracelular de Fe libre y reducido por desplazamiento de sus sitios de almacenamiento (27,34). El Al puede promover la peroxidación desencadenada por el Fe, a través de su unión a fosfolípidos de membranas, induciendo cambios en su organización y en la distribución de lípidos que pueden facilitar la propagación de la peroxidación lipídica (35-37).

Cierto número de evidencias indican que el aluminio acumulado intracelularmente es responsable de efectos estimulatorios e inhibitorios sobre procesos celulares. Estos efectos suelen ser bifásicos, estimulatorios a bajas

concentraciones e inhibitorios a altas concentraciones (2). Frecuentemente la respuesta celular está asociada con el sistema de segundos mensajeros, sugiriéndose como mecanismo tóxico la interferencia del aluminio sobre el ciclo de la GTPasa, particularmente sobre la función de la proteína G, lo que podría producir profundos efectos sobre la función celular (2).

Otros eventos intracelulares, tales como un inadecuado aporte de energía debido a la formación de complejos de Al-ATP, y perturbación de funciones nucleares podrían estar involucrados en la disfunción celular inducidos por el Al (38).

1.1.5 Patologías relacionadas con el Aluminio.

Si bien han transcurrido más de 100 años desde los estudios pioneros de Siem y Dölken sobre la neurotoxicidad del Al en animales de experimentación (4), la posible toxicidad en los humanos desde ese momento ha sido materia de controversia.

Como se expresó anteriormente, el Al no tiene una función biológica conocida en los seres vivos, pero ha sido demostrado su toxicidad biológica en modelos experimentales y, en particular, en pacientes en estadio terminal de enfermedad renal con diálisis regular contribuyendo a varios desórdenes como encefalopatía dialítica (39,40), osteodistrofia renal (27,41) y anemia microcítica (27,39,42-44). El Al posee acción neurotóxica, su acumulación ha sido relacionado a procesos degenerativos en la enfermedad de Alzheimer (14,15,45). Por otra parte, si bien la contaminación de Al en los dializados ha

disminuido en las últimas dos décadas, constituye aún el principal agente causal en el bajo turnover óseo, osteomalacia y hueso adinámico en pacientes con alteraciones de la función renal (46).

El riesgo de toxicidad por el Al no está limitado a pacientes con insuficiencia renal crónica, donde las elevaciones del mismo en suero y su acumulación tisular han sido siempre consideradas como una consecuencia de la reducida capacidad de excreción de este elemento por vía renal, ya que pacientes con función renal normal y aún individuos sanos expuestos al Al pueden constituir blancos de la toxicidad del mismo. Un grupo susceptible está constituido por los recién nacidos particularmente a pretérmino, con función renal normal (47).

1.1.6 Efectos del aluminio sobre el hígado

Una exposición crónica al Al puede producir efectos adversos en humanos y en animales de experimentación. En estos últimos, ha sido demostrado que la exposición crónica al Al ha estado asociada a una acumulación de dicho elemento en riñón, estómago, cerebro e hígado (48,9).

Las alteraciones producidas por intoxicación crónica con Al en la función secretoria biliar ha sido descrito anteriormente (49), entre ellas ratas expuestas 1-14 días al Al (5mg/kg p.c. por día. i.v), incrementan la concentración de sales biliares en suero, lo que estaría asociado a una reducción en el flujo biliar (FB) y a una alteración en la relación de sales biliares glicina/ taurina (50). Algunos autores, encontraron en microsomas una

reducción en los niveles de citocromo P450, enzima de la fase uno de detoxificación hepática (51).

Klein y col. (50) describieron que la exposición crónica al Al en animales de experimentación produce una reducción del 30% del flujo biliar, así como también una alteración en el transporte hepático de aniones orgánicos, como la bromosulfoftaleína (BSP) (51). Esta información resulta muy relevante ya que estos sistemas de transporte involucrados en la eliminación de estas sustancias son también los sistemas que eliminan compuestos potencialmente tóxicos, endo-xenobióticos, incluyendo bilirrubina, sales biliares glucuronizadas y sulfatadas, medicamentos etc (52).

Por otro lado, el Al interfiere con las enzimas involucradas en la eliminación de radicales libres incrementando la actividad de la enzima xantina oxidasa y disminuyendo la actividad de la enzima Glutation peroxidasa (GSH-Px) (53).

Ha sido reportado una elevación de la lipoperoxidación microsomal acompañado de una disminución en la actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) en el hígado de ratas tratadas con una administración intraperitoneal de $AlCl_3$ (54). Estos efectos están asociados con un decrecimiento en los niveles hepáticos de defensas antioxidantes incluyendo glutatión (GSH) (55,56), CAT (55) y GSH-Px (55). Además, ha sido reportado un decrecimiento en la actividad de la enzima detoxificadora GST, que puede ser un factor que contribuya a disminuir la detoxificación de lípidos hidroperóxidos (56,57).

1.2. EL HÍGADO COMO ÓRGANO EXCRETOR

1.2.1 Mecanismos de formación de la bilis

El hígado es responsable de la síntesis y excreción de sales biliares (SB), como así también de la captación y posterior eliminación biliar de las que retornan al hígado por la circulación enterohepática. Estos procesos constituyen el principal aporte del hígado a la digestión y absorción intestinal de lípidos pero además, la excreción de SB resulta fundamental para la formación de bilis. La existencia de una estrecha correlación entre el FB y la velocidad de excreción de sales biliares (VESB), pone de manifiesto la importancia de las SB como factor determinante del volumen y composición de la bilis secretada.

La secreción biliar es un proceso que comprende por lo menos tres etapas: síntesis o captación de una variedad de sustancias por la célula hepática, transporte de sustancias dentro de la misma y excreción de agua y compuestos orgánicos e inorgánicos en el canalículo biliar.

La bilis secretada por el hígado es una solución acuosa en la que se hallan los mismos componentes electrolíticos inorgánicos del plasma, junto con solutos orgánicos, pigmentos biliares y bajas concentraciones de proteínas (58).

Las concentraciones de sodio, potasio, calcio y bicarbonato en la bilis, son algo superiores a las que estos mismos iones tienen en el plasma. Esta mayor concentración iónica biliar puede estar condicionada por su incorporación a agregados polimoleculares micelares, de bajo poder osmótico. Los principales solutos orgánicos de la bilis son los ácidos biliares, los

fosfolípidos, el colesterol, los pigmentos biliares y las proteínas que se encuentran en muy bajas concentraciones.

Los AB se encuentran en la bilis en forma aniónica, es decir, en forma de SB y conjugados con taurina y glicina. Se trata de moléculas anfipáticas, es decir, en las que hay zonas con apetencia por el agua y otros que no la tienen. Cuando varias de estas moléculas se hallan en el agua, se unen entre sí, formando complejos macromoleculares llamados micelas.

Las SB circulan en la sangre fijada principalmente a la albúmina, siendo su grado de unión inversamente proporcional a su polaridad (59,60). Al arribar a territorio sinusoidal, estos compuestos son captados con extraordinaria eficiencia por los hepatocitos con una relación de extracción mayor del 90%(61). Estas SB tienen un rol fundamental en la regulación de la secreción de colesterol y fosfolípidos (62). La asociación de SB y lecitina, resulta importante para la solubilización del colesterol (63).

La bilis cumple dos funciones principales:

- la de proporcionar al intestino AB que faciliten la absorción de grasas y de vitaminas liposolubles,
- la de eliminar sustancias residuales del catabolismo celular que no pueden serlo por otra vía. Este es el caso de la bilirrubina, como producto de la degradación de la hemoglobina y el del colesterol (58).

El concepto postulado por Sperber en 1959 (64) que establece que la formación de la bilis es un proceso osmótico cuya fuerza impulsora está dada por la secreción activa al canalículo de compuestos osmóticamente activos, ha sido confirmado definitivamente por estudios subsiguientes. Por el contrario,

cambios en la presión de perfusión sinusoidal no afectan la formación normal de bilis (65). Para que un soluto sea capaz de promover el transporte primario de agua desde la sangre sinusoidal a la luz canalicular, éste debe ser secretado activamente y concentrado en el espacio canalicular. Una vez secretado, este soluto puede promover el movimiento de agua a través de las rutas paracelular y transcelular; este último camino se encuentra facilitado por la existencia de canales de agua (aquaporinas) en los dominios de membrana basolateral y canalicular del hepatocito.

1.2.2 Fisiología de la secreción biliar.

La secreción biliar es el resultado de una serie de procesos de transporte cuya unidireccionalidad es posibilitada por la alta polarización del hepatocito producto de su heterogeneidad estructural y funcional (66). En efecto, el hepatocito presenta dos dominios de membrana claramente diferenciables. La membrana basolateral, también llamada sinusoidal por su adyacencia a los capilares sinusoidales, está altamente especializada en la captación de sustancias endógenas o exógenas que llegan principalmente por vía portal. La mayoría de ellas, como la bilirrubina (67) y las SB (68,60) se encuentran fuertemente unidas a la albúmina. Su otro dominio, el canalicular, constituye el polo secretor del hepatocito y representa sólo un 13 % de la superficie total de la membrana plasmática del hepatocito (69). A diferencia de la filtración glomerular renal donde la fuerza impulsora de los movimientos acuosos es principalmente hidrostática, el transporte de agua a través del

epitelio hepático es el resultado de un proceso de filtración osmótica (70). Así la secreción canalicular concentrativa de diferentes sustancias escasamente difusibles crea un gradiente osmótico capaz de promover el movimiento de agua por vía trans y paracelular hacia el canalículo biliar hasta alcanzar el equilibrio osmótico con el plasma.

Una de las principales fuerzas impulsoras de este movimiento es aportada por las SB, responsables de la fracción del FB denominada flujo biliar dependiente de sales biliares (FBDSB) (71,72). La fracción restante es aportada presumiblemente por aniones orgánicos diferentes de las SB entre los que probablemente se encuentran el GSH y el HCO_3^- (73). Esta última fracción representa el flujo biliar independiente de sales biliares (FBISB) siendo postulado que el ión HCO_3^- cumple un rol fundamental en la formación de esta fracción del FB (74).

El gradiente de Na^+ generado por la Na^+/K^+ -ATPasa es utilizado para el intercambio Na^+/H^+ , el cual elimina H^+ del citosol; estos H^+ neutralizan el HCO_3^- extracelular, permitiendo su subsiguiente difusión pasiva como CO_2 (74). El HCO_3^- plasmático puede también ser captado por el sistema de co-transporte $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$, localizado en la membrana basolateral del hepatocito (75). En el polo canalicular, el intercambio de $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$, mediado por el “intercambiador aniónico 2” (“*anion exchange 2*”, AE2), es el responsable de la excreción de HCO_3^- , a la bilis canalicular (76). El rol postulado para HCO_3^- en la formación del FBISB se respaldó inicialmente en observaciones realizadas por Hardison y Wood (62), quienes reportaron una disminución del FB en hígados aislados perfundidos con una solución amortiguadora a la cual se le había

reemplazado el HCO_3^- por tricina. Sin embargo, la tricina es un compuesto escasamente difusible, con lo cual existe la posibilidad que esta disminución del FB se debiera a un reflujo de agua desde la bilis al plasma, estimulado por una fuerza osmótica; de hecho, esto mismo ocurrió cuando el Cl^- en lugar del HCO_3^- , fue reemplazado por tricina (77). Además, se cuestiona si es posible mantener un gradiente bilis-perfusato de HCO_3^- , debido a la alta permeabilidad de este anión por la vía paracelular, sugerida por estudios realizados en hígados aislados y perfundidos de rata (78) y en el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de ratas (75). Por lo tanto, el rol exacto del HCO_3^- , en la formación del FBISB permanece incierto. Sin embargo, se han reportado estudios en los cuales se encontraron elevaciones en el FBISB debidas sólo a un aumento en la excreción biliar de HCO_3^- , como por ejemplo luego de la administración de monofosfato cíclico de guanosina (79).

Otro posible mecanismo involucrado en la formación del FBISB es el mediado por GSH. Este tripéptido es secretado a bilis en concentraciones relativamente altas (5-10 mM), principalmente en su forma reducida. La evidencia que sostiene un rol del GSH en la formación del FB fue obtenida en forma indirecta mediante la administración de agentes farmacológicos que modulan su excreción (80) y, en forma más directa, mediante la administración del propio GSH, su monoetil ester o sus tres aminoácidos constituyentes (81). Estas manipulaciones lograron aumentar la excreción biliar de GSH, provocando un aumento proporcional del FB.

Los mecanismos de transporte de GSH a nivel hepatocelular no han sido claramente dilucidados hasta el presente. El hígado es el principal lugar de

síntesis de GSH, el cual es exportado a la sangre y a la bilis. No obstante, no se ha detectado captación biliar de GSH a las concentraciones plasmáticas fisiológicas (50 μ M) (82). El sistema transportador "*organic anion transporter polypeptides*" (Oatp1), funciona como un intercambiador de aniones orgánicos con GSH intracelular (83), con lo cual podría estar involucrado en el transporte de GSH a sangre sinusoidal; este concepto es sostenido por el hecho que sustratos de Oatp1 inhiben competitivamente la salida de GSH del interior del hepatocito (84). Sin embargo, es probable que otro u otros transportadores estén implicados en el transporte sinusoidal de GSH, dado que este proceso es sensible a tiones y a cambios en el potencial de membrana, a diferencia del transporte mediado por Oatp1 (85).

Los transportadores que median la secreción canalicular de GSH tampoco han sido totalmente caracterizados. Mediante estudios funcionales, se pudo caracterizar un sistema de transporte electrogénico de alta afinidad (86-88). Este sistema de transporte, aún no identificado, puede funcionar transfiriendo grandes cantidades de GSH reducido a bilis, siendo también capaz de transportar con menor afinidad GSSG y compuestos conjugados con GSH. El sistema de transportador "*proteínas asociadas a la resistencia a multidroga*" (Mrp2), por su parte, ha sido caracterizado como un sistema de transporte de baja afinidad para el GSH, pero capaz de transportar glutatión oxidado (GSSG) y compuestos conjugados con GSH con alta afinidad (86).

Por su parte, otros constituyentes biliares, como bilirrubina, proteínas y restantes electrolitos (en especial sodio y potasio), aunque cuantitativamente importantes (89), son incapaces de promover primariamente flujo acuoso en

magnitudes apreciables (90).

1.2.3 Sistemas de transporte en el hepatocito

El papel fundamental de la bilis es proveer micelas mixtas para facilitar la digestión y absorción de los lípidos de la dieta y servir a la vez como vía de excreción de drogas y otros metabolitos. Las investigaciones efectuadas se han ocupado, en particular del transporte hepático de AB y de un pequeño grupo de otros compuestos de importancia diagnóstica, incluyendo bilirrubina, agentes radiopacos y varios colorantes como rosa de bengala (RB), BSF, entre otros. Estas sustancias varían en su estructura química y presentan distintos grupos ácidos: carbonílico, sulfónico u otros (91) que al pH normal del plasma y de la bilis se presentan como aniones (92,93).

El hepatocito es una célula polarizada que expresa diferentes sistemas de transporte en sus dominios de membrana sinusoidal (basolateral) o canalicular (apical). Estos transportadores juegan un rol clave en el transporte vectorial de solutos y agua desde la sangre sinusoidal a la bilis, contribuyendo así a la formación de la misma y también a la excreción de muchos xenobióticos. Muchas de estas proteínas transportadoras han sido identificadas recientemente mediante clonado molecular y sus propiedades de transporte han sido caracterizadas mediante estudios funcionales. Su localización celular y su función se encuentran esquematizadas en la Figura 1-1.

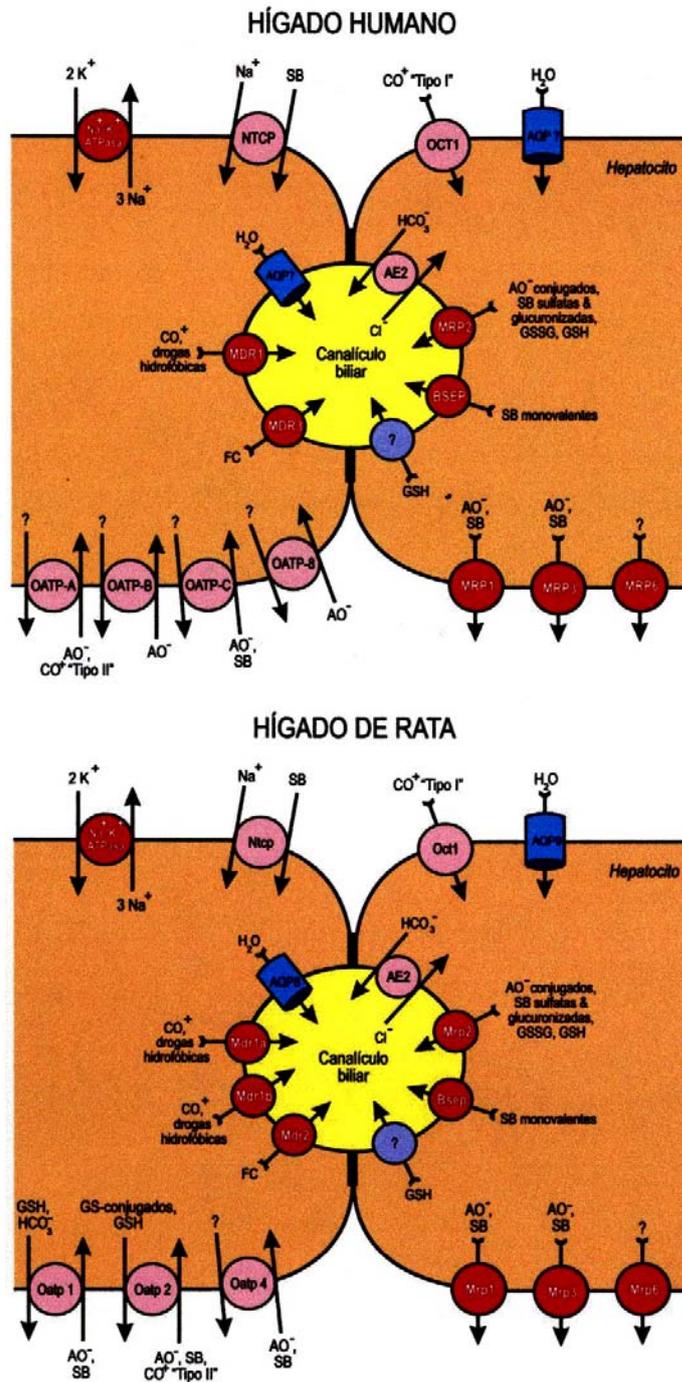


Figura 1-1 Sistemas de transporte del hepatocito. Abreviaturas usadas: AO⁻, aniones orgánicos; CO⁺, cationes orgánicos; SB, sales biliares; GSH, glutation reducido; GSSG, glutation oxidado; GS-conjugados, compuesto orgánicos conjugados con GSH; FC, fosfatidilcolina.

1.2.3.1 Transporte basolateral

Los capilares sinusoides hepáticos poseen una arquitectura específica que permite que compuestos orgánicos unidos a la albúmina atraviesen el endotelio y se dirijan hacia el espacio de Disse, desde donde estos compuestos pueden ser captados por los sistemas de transporte sinusoidal del hepatocito (94). Estos sistemas de transporte pueden ser divididos en dos grupos: dependientes de Na^+ e independientes de Na^+ , cuya fuerza impulsora está dada por el gradiente electroquímico de Na^+ , generado y mantenido por la Na^+/K^+ -ATPasa, estratégicamente ubicada en la membrana sinusoidal. El transporte de aniones orgánicos independiente de Na^+ es llevado a cabo principalmente por intercambio aniónico.

Las sales biliares son captadas por el hepatocito utilizando ambos sistemas, tanto el dependiente de Na^+ como el independiente de Na^+ . El transporte dependiente de Na^+ de SB conjugadas con glicina o taurina es considerado el principal mecanismo de captación de SB por el hepatocito (95). Es mediada por el "polipéptido cotransportador de Na^+ y taurocolato" ("*Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*", Ntcp, Slc10a1), el cual ha sido aislado y clonado a partir de hígado de rata (96) y de hígado humano (NTCP,SLC10A1), siendo la fuerza impulsora de ese transporte el gradiente transmembrana de Na^+ , generado y mantenido por la Na^+/K^+ -ATPasa (97).

Diversas proteínas integrales de membrana basolateral, tales como la "bilitranslocasa", la "proteína de unión a bromosulfoftaleína" (BSF/bilirrubina) y la "proteína de unión a aniones orgánicos", han sido postuladas como sistemas

de transporte involucrados en la captación hepatocelular de aniones orgánicos distintos de las SB, tales como la bilirrubina y BSF (98,99). Hasta el presente, varios miembros de la familia de "polipéptidos transportadores de aniones orgánicos" (*organic anion transporter polypeptides*), OATP (SLC21A) y Qatp (S1c21a), en humanos y ratas respectivamente) han sido caracterizados funcionalmente e identificados por clonado molecular. Los Oatps/OATPs son capaces de aceptar una amplia variedad de compuestos orgánicos anfipáticos, incluyendo las sales biliares conjugadas y no conjugadas, compuestos orgánicos exógenos (ej: BSF), bilirrubina, leucotrienos, conjugados de estrógenos, hormonas tiroideas, micotoxinas y numerosos xenobióticos (98,100).

La membrana basolateral de los hepatocitos también posee varias bombas dependientes de ATP, las cuales pertenecen a la familia de las "proteínas asociadas a la resistencia a multidroga" ("*multidrug resistance associated proteins*", Mrp y MRP en ratas y humanos, respectivamente (101).

La captación de cationes orgánicos por los hepatocitos es mediada por dos sistemas de transporte independientes, cuya función esta relacionada al tamaño molecular del sustrato (102).

Estudios recientes, demostraron la expresión del canal de agua aquaporina 9 (AQP9) en la membrana basolateral de hepatocitos de rata (103,104) que también funcionan como canales selectivos de agua en muchas células epiteliales.

1.2.3.2 Conjugación y fijación intracelular

Una vez dentro del hepatocito, las SB se unen a proteínas citosólicas y atraviesan la célula por difusión. Las principales proteínas citosólicas capaces de unir SB en los roedores y en humanos son la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (105) y la "proteína de unión a sales biliares de alta afinidad" ("*High affinity bile acid binding protein*", HBAB) (106), respectivamente. La enzima GST (107,108) y la "proteína hepática de unión a ácidos grasos" ("*Hepatic fatty acid binding protein*", H-FABP") (109) también pueden unir sales biliares, particularmente las SB sulfatadas (110), aunque con menor afinidad.

En general, los aniones orgánicos excretados en bilis, son conjugados en el hepatocito con grupos polares como ácido glucurónico o aminoácidos como factor condicionante de su excreción biliar. Con la sola excepción de los AB, la fijación intracelular de aniones orgánicos se efectúa a dos proteínas citoplasmáticas denominadas ligandina y fracción 2 (111). La ligandina, que es cuantitativamente la más importante es idéntica a la glutatión S-transferasa B (112), enzima que cataliza la conjugación de BSF y otros sustratos con glutatión. No obstante, la afinidad de fijación de la enzima no está limitada a sus sustratos (113). Por ejemplo, la ligandina también fija bilirrubina, RB, ácidos grasos y azules de Evans, ninguno de los cuales es conjugado con GSH. Las constantes de asociación de estos ligandos son del mismo orden de magnitud que el de la BSF y en el caso de la bilirrubina, aún mayor.

Si el proceso de captación es bidireccional y equilibrado, puede ser que la fijación posibilite el aumento del contenido intracelular en el estado

estacionario. Ello serviría para acelerar la difusión intracelular simplemente por aumento de la concentración citosólica. Otra posibilidad es que la fijación intracelular facilite específicamente la llegada de los solutos al lugar de conjugación o a los sistemas de transporte canaliculares. La ligandina posiblemente también tenga un rol protector, sustrayendo sustancias potencialmente tóxicas de sitios donde pueden ocasionar daños. Por ejemplo, la ligandina "*in vitro*", protege la respiración mitocondrial de los efectos depresores de la bilirrubina (114). Este efecto no es específico ya que la albúmina sérica también lo exhibe.

En general, todo lo que se sabe sobre la fijación de sustancias a la ligandina, refuerza la idea de que actúa a nivel intracelular, como lo hace la albúmina en el plasma (110). De todos modos, ni la fijación, ni la actividad catalítica de la ligandina parecen ser esenciales para el transporte hepático de la BSF ya que algunas especies como tiburones y rayas, concentran este colorante en bilis, aunque sus hígados no contienen ligandina (115).

1.2.3.3 Transporte canalicular

El transporte a través de la membrana canalicular de los hepatocitos representa la etapa limitante en el transporte global de sangre a bilis de la mayoría de los constituyentes endógenos de la bilis y también de numerosos xenobióticos (116). Este transporte está primordialmente mediado por bombas dependientes de ATP, las cuales pertenecen a la superfamilia de "transportadores con *cassette* de unión al ATP" ("*ATP-binding cassette*", ABC).

Las "proteínas de resistencia a multidrogas" ("*multidrug resistant protein*", MDR), también conocidos como P-glicoproteínas, son miembros de la superfamilia ABC (117), originalmente descritas en líneas celulares cancerosas, donde confieren resistencia a agentes quimioterapéuticos. Estos fueron los primeros transportadores ABC identificados en la membrana canalicular de hepatocitos normales. Tres productos génicos fueron identificados en ratas, Mdr1a (Abcb1a) y Mdr1b (Abcb1b) y Mdr2 (Abcb4) y dos en humanos, MDR1 (ABCB1) y MDR3 (ABCB4).

La secreción canalicular de SB está mediada por una proteína transportadora homóloga a la P-glicoproteínas, por lo cual fue inicialmente llamada "hermana de la P-glicoproteína" ("*sister of the P-glycoprotein*", Spgp) (118). Este transportador, también perteneciente a la superfamilia ABC, es ahora conocido por su nombre funcional, "bomba exportadora de sales biliares" ("*bile salt export pump*", Bsep). En pacientes con colestasis intrahepática progresiva familiar de tipo 2, se encontraron mutaciones del gen que codifica para BSEP (ABCB11), las cuales conducen a la total ausencia de BSEP en el hígado de estos pacientes; esta alteración es acompañada de un nivel de excreción biliar de SB menor al 1% del valor normal (119), lo cual sustenta un rol primordial de BSEP en el transporte canalicular de SB en el hígado humano.

La membrana canalicular hepática de los mamíferos también posee un miembro de la familia MRP/Mrp de transportadores del tipo ABC, inicialmente conocido como "transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico" ("*canalicular multiespecific organic anion transporter*", cMoat), ahora más comúnmente llamado "proteína asociada a la resistencia a multidrogas 2"

("multidrug resistance associated protein 2", Mrp2). Este transportador media la excreción biliar de diferentes aniones orgánicos, incluyendo compuestos conjugados con GSH (ej: leucotrieno C4 o BSF) o ácido glucurónico (ej: bilirrubina y estrógenos), así como también GSSG (120). Mrp2 media también el transporte de sales biliares glucuronizadas y sulfatadas (100,121,122). Además, Mrp2 es capaz de transportar GSH, aunque con baja afinidad (123). Un sistema de transporte canalicular alternativo de GSH, pero con alta afinidad, ha sido caracterizado mediante estudios funcionales (124), quedando aún pendiente su identificación mediante clonado molecular.

El "intercambiador aniónico 2" ("*Anion exchanger 2*", AE2) es una proteína canalicular que media el contra-transporte de $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$, participando así en la excreción canalicular de HCO_3^- (125). AE2 pertenece a una familia de intercambiadores aniónicos independientes de Na^+ (AE1, AE2 y AE3), los cuales median el intercambio electroneutro de Cl^- por HCO_3^- a través de la membrana celular en varios tejidos. AE2 se localiza en hígado tanto en la membrana canalicular de los hepatocitos como en la membrana apical de las células epiteliales de los conductos biliares intrahepáticos (126).

Recientemente, fue detectado en el dominio de membrana canalicular el canal de agua AQP8, que podría facilitar el movimiento osmótico de agua ante la presencia de un estímulo colerético que induzca su expresión (104).

1.2.4 Posibles mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo de hepatotoxicidad

La enorme variedad de agentes que son capaces de producir daño hepatocelular permite concluir que el hombre está inmerso en una verdadera jungla química. El daño resultante de la acción de un compuesto químico sobre el hígado, es un fenómeno multifacético por la participación de factores de distinta naturaleza. Como por ejemplo la naturaleza del agente hepatotóxico, las características de la lesión, el mecanismo que conduce a los efectos tóxicos entre otros.

Muchos agentes hepatotóxicos son productos de la industria química y farmacéutica, bioproductos industriales o materiales de desecho, que contaminando al medio ambiente, pueden tener acceso al ser humano (127-129). El carácter de la injuria también incluye distintos grados de lesión. Algunos conducen a necrosis, esteatosis, cirrosis o carcinoma. Otros interfieren con la secreción biliar y producen ictericia, sin daño aparente del parénquima hepático (130-133).

El hígado es el órgano donde, preferentemente, se desarrollan la mayoría de las reacciones metabólicas, siendo lógico que, ante el estímulo de los tóxicos, responda con unas reacciones que, en ocasiones, significan daño grave para el órgano. Por ello, el hígado es el órgano que normalmente sirve de indicador de las alteraciones metabólicas inducidas por los tóxicos. El incremento del peso relativo de este órgano, aunque puede producirse como respuesta fisiológica a un aumento de su función o por efecto de reguladores

endócrinos, del tipo de las hormonas tiroideas o glucocorticoides, suele ser efecto de hipertrofia e hiperplasia por causa tóxica.

El hígado responde a los estímulos tóxicos con una proliferación del retículo endoplásmico liso, para incrementar la actividad de las enzimas metabolizantes de drogas. Esta proliferación puede progresar hasta alcanzar un grado patológico (manifestación de hepatotoxicidad), y entonces producirse una regresión en el nivel funcional adquirido; ello coincide con la afectación de las mitocondrias y peroxisomas (133).

Según se enfoque desde el punto de vista de la integridad de la estructura celular o de la normalidad de la función celular (134) los mecanismos profundos de acción tóxica pueden resumirse en:

- Los mecanismos tóxicos que lesionan la arquitectura celular pueden consistir en alteraciones más o menos profundas de las estructuras proteicas, que conducen a la destrucción total de la célula, o solamente de la membrana celular, lo cual originará la salida de su contenido. Una afectación más selectiva puede lesionar sólo a estructuras y orgánulos subcelulares, por ejemplo, retículo endoplásmico, mitocondrias, ribosomas, lisosomas, que respectivamente provocarán trastornos en las futuras actividades metabólicas, en la síntesis proteica, o bien sucesivas destrucciones místicas al liberarse las enzimas productoras de lisis, que se hallan almacenadas en los lisosomas (134).
- Las alteraciones de la función celular pueden a su vez deberse a:
 - Modificaciones de la permeabilidad de la membrana, que no sólo afectarán a la entrada y salida de alimentos, fármacos y excretas,

sino también de los iones Na, K y Ca, responsables de los fenómenos de polarización y despolarización de la membrana y, en definitiva, de la transmisión eléctrica del impulso nervioso.

- Modificación de la actividad enzimática, por afectación de una enzima o sistema enzimático (coenzima, etc) con alteración de los procesos respiratorios, energéticos, nerviosos, catabólicos, etc., en que aquella interviniere. Los principales tóxicos enzimáticos son: moléculas orgánicas que por su estereoisomería bloquean los lugares activos de la enzima, elementos metálicos que bloquean los grupos tioles (-SH) enzimáticos como Al, Pb, Cu, Ag, Mn y/o sustancias que se copulan con los elementos indispensables para la función enzimática.
- Modificación de la reproducción celular, que puede ser a nivel de ribosomas, con afectación de la síntesis proteica, o a nivel de alteraciones celulares transmisibles (mutagénesis), no transmisibles (carcinogénesis) o congénitas (teratogénesis) (133).

Las principales reacciones hepatotóxicas pueden ser:

- a- Necrosis zonal o centrolobulillar. El tóxico podría producir un radical que actuaría sobre el retículo endoplásmico con inhibición de la síntesis proteica, al propio tiempo que podría provocar la peroxidación de los lípidos de las membranas mitocondriales y lisosomales, originando la salida de sus fracciones enzimáticas. A su vez, los trastornos enzimáticos podrían promover la inhibición de síntesis proteica, necrosis celular y otras alteraciones afectando la funcionalidad hepática que a su

vez podría afectar por ejemplo la excreción de los triglicéridos, conduciendo a acumulación grasa.

- b- Hepatitis tipo vírica. La lesión anatómica puede ser como la de la necrosis centrolobulillar, con la aparición al microscopio de los cuerpos Councilman (imagen de hepatocitos necrosados).
- c- Colestásis intrahepática. Cuando se produce una obstrucción de las vías biliares intrahepáticas o extrahepáticas, se podría originar un cuadro icterico obstructivo. La lentitud del flujo biliar determina la precipitación de pigmentos biliares en elementos hepáticos, originándose la ictericia. También en ocasiones el proceso puede deberse a modificaciones en el equilibrio fisico-químico de la secreción biliar, y variarse la concentración de los AB.
- d- Otras lesiones diversas: cirrosis, hígado graso, lesiones vasculares y porfirias.

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

1.3.1 Generalidades

Se puede definir estrés oxidativo como una alteración del equilibrio entre agentes prooxidantes y agentes antioxidantes, en favor de los primeros; esta alteración puede ser debida a un exceso de agentes prooxidantes o a una deficiencia de agentes antioxidantes o a ambos factores a la vez. Ante este desbalance, se origina una alteración en el estado redox de la célula,

produciéndose una respuesta de la misma que tiende a contrarrestar la acción oxidante (135).

Agentes prooxidantes son todos aquéllos que, bien de una manera directa o indirecta, son capaces de oxidar otras moléculas, que en el caso concreto de los seres vivos, se oxidan biomoléculas. Los agentes prooxidantes más importantes son los que derivan de moléculas oxigenadas, más conocidos como especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) (136). Bajo condiciones fisiológicas normales, las células producen ROS como:

- Radical hidroxilo, el cual tiene gran reactividad.
- Peróxido de hidrógeno y anión superóxido, los cuales tienen una escasa reactividad *per se*, estos pueden transformarse fácilmente en el radical hidroxilo, especialmente en presencia de hierro. La producción de estas especies reactivas ocurre de manera constante en el organismo; esta producción puede tener un origen tanto endógeno como exógeno (137).

Generalmente se cree que la supervivencia celular depende de las defensas antioxidantes que se encargan de la remoción de especies de oxígeno tóxicas. Este sistema de defensas antioxidantes trata en un primer momento de evitar la producción de estas especies, luego de reducir estas moléculas tan reactivas, y por último de reparar el daño producido (138). Podemos hablar de sistemas antioxidantes enzimáticos y de no enzimáticos. Dentro de los primeros se encuentran las enzimas que tienen como función la protección antioxidante, tales como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y superóxido dismutasa (SOD); en el segundo se tiene las moléculas que pueden reaccionar directamente con las especies activadas y radicales

libres, o bien con los productos de reacción de éstas, sin que sea necesario ninguna intervención enzimática. Entre estos antioxidantes se incluyen principalmente el glutatión (GSH), la vitamina C y E, los β -carotenos, ácido úrico y los flavonoides. Estos radicales pueden causar una gran variedad de alteraciones nocivas en las células incluyendo peroxidación de lípidos de membrana, inactivación de enzimas y daño al ADN.

La injuria producida por el efecto tóxico del oxígeno a través de la generación de los radicales libres debe ser prevenida por los mecanismos generados por el hígado. Estudios experimentales han demostrado claramente como la injuria hepática está asociada al estrés oxidativo.

El nivel de estrés oxidativo está bajo control genético, aumenta con la diferenciación celular y el envejecimiento. En el primer caso, disminuye la concentración de GSH cuando las células pierden la capacidad regenerativa, y permanece constante o aumenta durante la diferenciación de los tejidos (139). En el envejecimiento el ambiente intracelular se va haciendo progresivamente más pro-oxidante lo cual se manifiesta por alteraciones en la proporción de los indicadores redox tales como NADH/NAD, NADPH/NADP y GSH/GSSG. En esta situación, el aumento de estrés oxidativo se refleja en un aumento de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno y en una disminución en el nivel de las defensas antioxidantes, especialmente de la actividad CAT y de la concentración de GSH (140,141).

La influencia oxidativa sobre la expresión genética durante el desarrollo puede también originar efectos indirectos sobre la forma espacial de la cromatina (142). Los radicales libres promueven el envejecimiento afectando

factores epigenéticos y/o programas genéticos específicos (143-145).

1.3.2 Glutation

El glutatión es uno de los compuestos más efectivos involucrado en los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo. Por otra parte, el GSH es sensible a las fluctuaciones en el nivel del estrés oxidativo (146).

Es uno de los péptidos celulares más importantes, y el principal tiol no proteico de la mayoría de las células. Se encuentra en dos formas principalmente, la reducida (GSH) y la oxidada (GSSG) (146).

Su acción antioxidante se puede ejercer de dos maneras:

- 1- Directamente: por medio de su grupo tiol, el glutatión reducido (GSH) puede captar un electrón de un radical libre, quedando como radical glutatiónilo (GS^{\cdot}); luego dos moléculas de este pueden unirse dando una molécula de glutatión oxidado (GSSG) (147).
- 2- Mediante el ciclo redox del glutatión: GSH reacciona con los radicales libres y ROS mediante una reacción enzimática catalizada por la GSH-Px en la que el mismo es oxidado. Por medio de la GSH-Px, el glutatión oxidado es reducido a expensa del NADPH (148).

1.3.3 Vitamina E

El estrés oxidativo es actualmente considerado como un factor patógeno importante en el desarrollo de muchas enfermedades. Existen muchas evidencias epidemiológicas que sugieren que las vitaminas antioxidantes como por ejemplo la vitamina E, pueden proteger contra diferentes enfermedades, como patologías cardiovasculares (149-151) y cáncer (152,153). Esto estaría relacionado con la capacidad de los antioxidantes para disminuir daños oxidativos endógenos a lípidos (154,155), proteínas (156) y ácidos nucleicos (157). En estudios realizados en cobayos, el tratamiento con una dieta rica en vitamina E, fue muy efectiva en la respuesta hepática a daños oxidativos (158) en forma similar a lo encontrado en ratas (159).

Una de las más importantes funciones de la Vit E o α -tocoferol es actuar como atrapador los radicales peróxil-lipídicos en las membranas biológicas y de este modo, previene la formación de productos de peroxidación lipídica altamente reactivos (160). Trabajos recientes han demostrado que la Vit E también reduce directamente la producción de ROS por interferencia con el montaje en el límite de la membrana de complejos NADPH-oxidasa (161). Nuevas evidencias indican que la Vit E, en adición a esto, tiene una función antioxidante ya que puede proteger tanto de la producción de cáncer aumentando la vigilancia inmunológica como afectar los caminos de traducción de señales envueltos en al regulación de la proliferación celular y apoptosis (162).

1.4 MUERTE CELULAR

1.4.1 Generalidades sobre apoptosis y necrosis

Dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis. Las características morfológicas de ambas, permiten, en la mayoría de los tejidos establecer claras diferencias.

La apoptosis se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte de una forma ordenada y silenciosa. Ha sido llamada “muerte celular programada”, ya que existen mecanismos intrínsecos celulares para el suicidio que es regulado por una variedad de caminos de señales celulares (163). Para que la muerte celular sea clasificada como apoptosis, existe condensación y fragmentación nuclear, con cromatina que se condensa agrupada en varios sectores formando cuerpos apoptóticos.

En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas y no todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido, resultando un proceso “silencioso”, sin inflamación. En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunas organelas, en especial las mitocondrias que tienen un rol interactivo importante. La membrana celular se retrae sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo (cuerpos

apoptóticos). Finalmente, fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo en una acción impecable, que se produzca alarma en el resto del tejido.

En contraste con la apoptosis, la necrosis es considerada el resultado final de una catástrofe bioenergética resultando con depleción de ATP a niveles incompatibles con la supervivencia celular y puede iniciarse por los llamados “accidentes celulares” como agentes tóxicos, traumáticos e hipóxicos; siempre patológicos (164,165). La necrosis es caracterizada morfológicamente por vacualización del citoplasma. Además, la destrucción de la membrana celular permite el escape al exterior de elementos tóxicos que provocan un proceso inflamatorio que tendrá efecto nocivo en el organismo, según la extensión del proceso. El material cromatínico sufre una dispersión irregular. En la necrosis se observan numerosas células vecinas sometidas a este proceso, cubriendo una extensión variable con desintegración.

1.4.2 Apoptosis inducidas por metales

Los metales son capaces de producir disturbios en el balance natural de oxido/reducción en células, a través de varios mecanismos provenientes de sus complejas reacciones redox con oxidantes endógenos y efectos sobre sistemas antioxidantes celulares. Como resultado del estrés oxidativo, se produce lipoperoxidación, daño a proteínas y daño al DNA, el cual puede contribuir a la toxicidad o carcinogénesis por metales.

El estrés oxidativo puede también afectar los niveles y funciones de moléculas señalizadoras con sensibilidad redox, tales como AP-1, NF- κ B y

p53, desarreglando las señales celulares y los sistemas de expresión genéticas y/o además la inducción de apoptosis. Tanto AP-1 y NF- κ B son considerados factores de transcripción en respuesta al estrés que gobiernan la expresión de una variedad de genes pro-inflamatorios y citotóxicos (166). La transactivación de AP-1 es requerida para la promoción tumoral en carcinogénesis de piel *in vivo*, indicando su importante rol para esta compleja regulación en cáncer (167). NF- κ B esta envuelto en una gran variedad de respuestas biológicas. En particular, está implicado en reacciones inflamatorias, control del crecimiento, apoptosis, e iniciación o aceleración de la carcinogénesis, y es el primer factor de transcripción que responde directamente al estrés oxidativo en ciertos tipos celulares.

La apoptosis es un importante proceso que tiene influencia en las transformaciones malignas de las células. Muchos autores han discutido los efectos pro-apoptóticos de los metales en tipos celulares selectivos (168), faltando delinear como este proceso podría contribuir a la transformación celular o carcinogénesis. Sin embargo, basado en numerosos hallazgos experimentales es claro que el estrés oxidativo juega un importante rol en los mecanismos moleculares de la toxicidad inducida por metales y carcinogénesis (169).

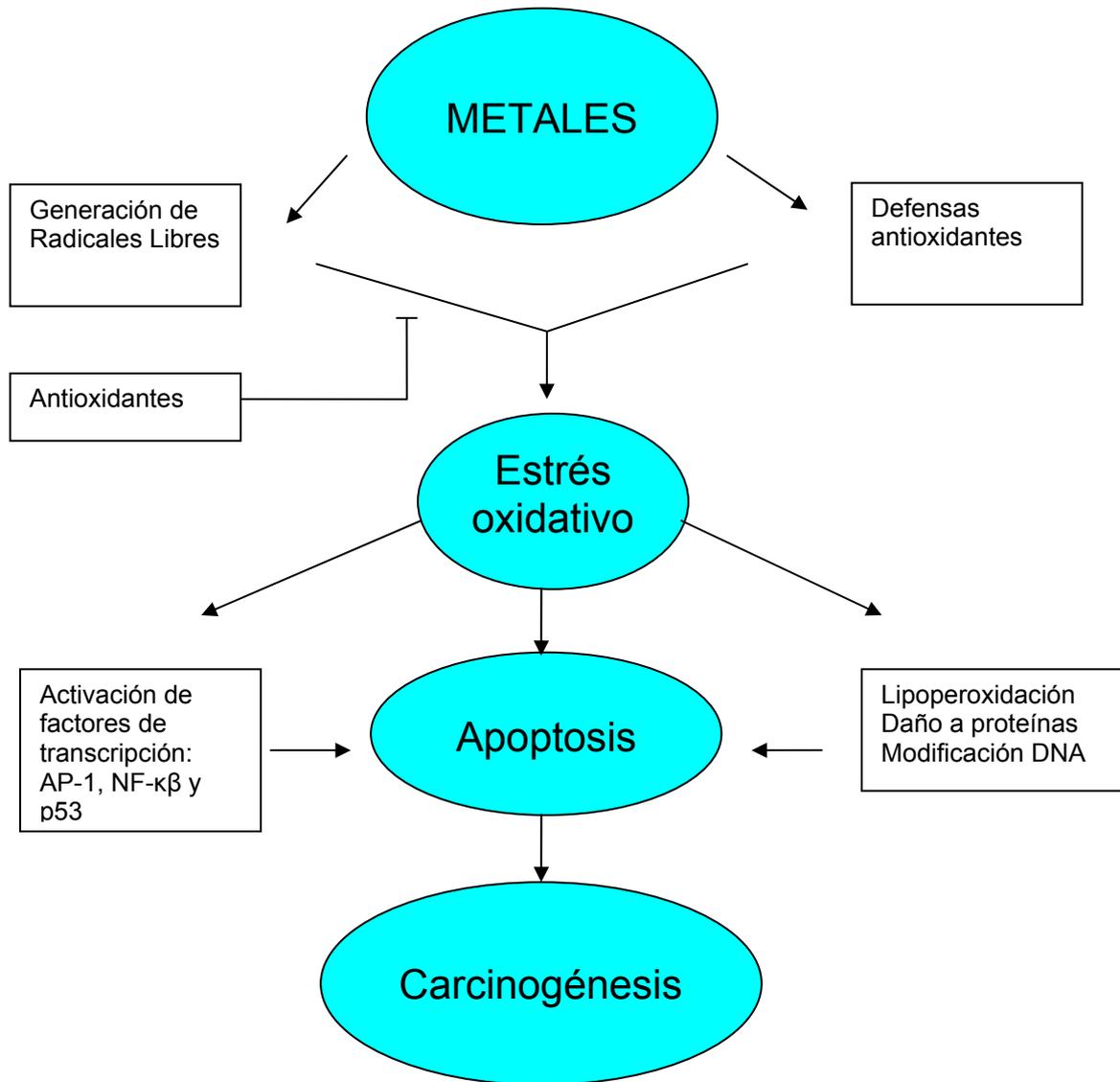


Figura 1-2: Estrés oxidativo inducido por metales.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Dada la considerable información bibliográfica referida a los efectos agudos del Al y en virtud del impacto que el mismo podría tener en exposiciones crónicas, fundamentalmente a nivel hepático, el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue estudiar las alteraciones hepáticas ocasionadas por la una exposición crónica al Al en animales de experimentación.

Se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluar las alteraciones en la función secretora biliar durante una exposición crónica al aluminio poniendo especial énfasis en el transporte biliar de aniones orgánicos.
- Analizar el estado funcional del transportador Mrp2, tanto en la generación del flujo biliar como en el transporte biliar de aniones orgánicos.
- Evaluar la producción de daño oxidativo a nivel hepático por el tratamiento crónico con Al y a su vez relacionarlo con la función secretora biliar.
- Analizar el efecto preventivo a través de un co-tratamiento con un agente antioxidante liposoluble como la Vit E sobre las alteraciones inducidas por el Al relacionadas a la formación de la bilis y la función secretora biliar.
- Valorar el grado de injuria hepática a través de estudios histológicos y del índice apoptótico inducidos por el Al y potencialmente prevenidos por el co-tratamiento con VitE.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3- METODOLOGÍA

3.1 ANIMALES

Se trabajó con ratas Wistar machos adultos (300-390 g) criadas en el bioterio de la Cátedra de Fisiología Humana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL.

Todos los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo a las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio ("Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health, EEUU, 1989). Los animales fueron mantenidos en un ambiente acondicionado con un ciclo luz-oscuridad de 12 hs, temperatura controlada (21-25 °C), con agua *ad libitum* y una dieta Standard para roedores.

3.2 ADMINISTRACIÓN DEL ALUMINIO

Para reproducir en animales de experimentación los efectos de una exposición crónica de Al en humanos, primeramente se fijaron las condiciones de trabajo en un modelo experimental. Para lograr este objetivo, es generalmente necesaria la administración de dosis apropiadas de aquellos compuestos que se estima puedan ser responsables del desorden en humanos, aunque es improbable que altos niveles del agente etiológico sean alcanzados. En particular, para estudiar los mecanismos de acción deletérea del catión Al^{+3} utilizamos dosis del mismo que permitan lograr cierta

acumulación a nivel tisular para de este modo, provocar cambios funcionales y/o alteraciones histológicas en el órgano estudiado. Cabe consignar, que no siempre dichas dosis pueden ser utilizadas para determinar su riesgo de exposición (170).

Se seleccionó la vía intraperitoneal como ruta de administración simulando las intoxicaciones alumínicas observadas durante los procesos de diálisis o de nutrición parenteral.

Para evaluar el efecto de la administración crónica de aluminio sobre la función secretora biliar se utilizó Al bajo la forma de Hidróxido de Al $[Al(OH)_3]$, compuesto con baja solubilidad y alta capacidad hidrolítica, que presenta la característica de ser uno de los principales compuestos responsables de las elevadas exposiciones al Al. La exposición crónica se fijó en un período de 3 meses, a través de inyecciones i.p. 3 veces por semana y las dosis empleadas fueron el resultado de evaluaciones dosis-respuesta de parámetros marcadores de exposición, utilizando dosis de 20, 40 y 80 mg/Kg pc (171). Los volúmenes de las dosis inyectadas estuvieron dentro de un rango de 0.3 a 0.5 ml según el tamaño del animal. Las soluciones se utilizaron dentro de los tres días a partir de su preparación, ya que el envejecimiento de las mismas acentúa la hidrólisis y la formación de complejos con los ligandos potenciales. Los grupos control recibieron solución fisiológica durante los mismos períodos y con igual frecuencia de administración. Una vez seleccionada la dosis experimental, se conformaron los siguientes grupos experimentales:

- [Al (+)]: ratas que recibieron Al (como hidróxido de Al) a una dosis de 27 mg de Al elemental /Kg pc, correspondiente a 80 mg de $Al(OH)_3$ /Kg pc ip,

en 0,5 ml de solución salina, tres veces por semana, durante 90 días consecutivos.

- [Al(-)]: ratas que recibieron solamente el vehículo (solución Salina), con un protocolo de administración igual al realizado en el grupo [Al (+)].

3.3 ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA E

Para evaluar el efecto preventivo de la vitamina E sobre las alteraciones inducidas por la administración crónica con aluminio, los animales correspondientes a los grupos experimentales Al(-) y Al(+) fueron a su vez divididos al azar en 2 sub-grupos experimentales cada uno:

- [Al (+)]: Animales tratados con Al bajo las condiciones mencionadas en 3.2 sin tratamiento con Vit E.
- [Al (-)]: Animales controles descritos en 3.2 sin tratamiento con Al ni con Vit E.
- [Al (+) E(+)]: Animales que fueron tratados con Al como en el grupo anterior e inyectados subcutáneamente en forma simultánea con vit E (α -tocoferol 0.95 g/ml, [Sigma Chemicals Co. St Louis, MO, USA]), a la dosis de 600 mg/Kg pc.

- [Al (-) E(+)]: Animales que recibieron solo vehículo como el grupo Al(-), inyectados subcutáneamente 3 veces por semana a una dosis de 600 mg/Kg pc.

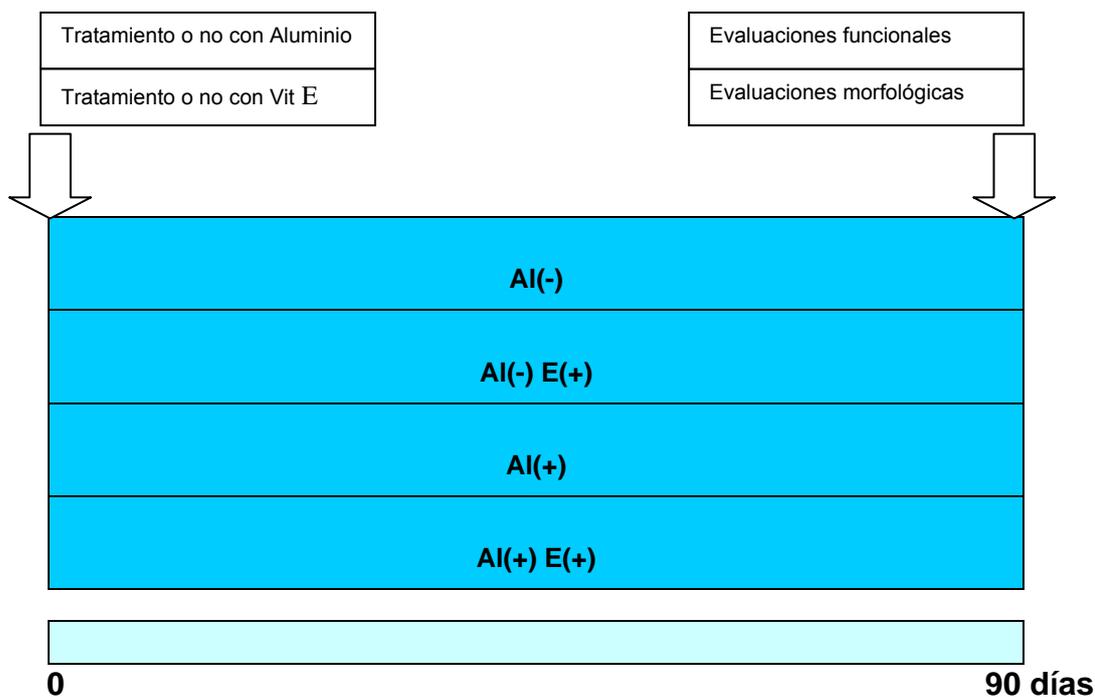


Fig 2.1 Protocolo del tratamiento experimental de los animales.

3.4 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Al cabo de los 90 días de tratamiento, según el grupo que corresponda, los animales fueron pesados y luego anestesiados con una dosis única intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg pc), y mantenidos en esta condición durante todo el experimento. La vena femoral y el conducto biliar común fueron cateterizados utilizando catéter de polietileno PC/50 (Intramedic,

Clay Adams, Parsippany, NJ EEUU) y un catéter de polietileno PE-10 (Intramedic Clay Adams, Parsippany, NJ EEUU) respectivamente. En todos los casos, se realizó una traqueotomía, colocándose un catéter en la tráquea para facilitar la remoción de la secreción bronquial inducida por el anestésico. La temperatura corporal fue mantenida en todo momento entre 37 °C y 38.5 °C con una lámpara infrarroja de calentamiento. Finalizados los experimentos los animales fueron sacrificados por exsanguinación y los hígados removidos y pesados.

3.5 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES FUNCIONALES

3.5.1 Estudios de la secreción biliar

Luego de la cateterización del conducto biliar común, se dejó drenar bilis libremente durante 30 min. A continuación, para evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre el FB, se recogió bilis por un período adicional de 30 min. El FB fue estimado gravimétricamente, asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/ml.

Las velocidades de excreción biliar de los distintos componentes excretados fueron calculadas como el producto del FB y las concentraciones biliares de los mismos. Atención especial acreditaron las determinaciones de las velocidades de excreción biliar de HCO_3^- y GSH. En el primer caso, la bilis se recogió durante 15 min en tubos pre-pesados conteniendo Vaselina líquida,

mientras que para GSH la bilis fue recogida durante 15 min en tubos pre-pesados conteniendo 1 ml de ácido sulfosalicílico al 6%.

3.5.2 Estimación de parámetros farmacocinéticos de transporte hepático

Estos estudios fueron llevados a cabo con la finalidad de estimar el estado funcional de los dos sistemas de transporte hepático de mayor relevancia fisiológica, esto es, aquéllos involucrados en la transferencia a bilis de aniones orgánicos colefílicos y de sales biliares.

Para evaluar los sistemas de transporte de aniones orgánicos, en un primer estudio se administró el colorante colefílico Bromosulfoftaleína (BSF) (Sigma Chemical Co.; St.Louis, MO, EE.UU). Luego de inyectar BSF (60 mg/Kg pc.) por vía intravenosa, se recogieron muestras de sangre cada 1-10 min durante 30 min y muestras de bilis en períodos de 10 min durante 60 min.

En otro estudio, a los fines de clarificar el rol de la conjugación hepática, se administró el colorante Rosa de Bengala (RB) en una dosis de 25 mg/Kg de pc (172). Se tomaron muestras de sangre cada 2 min durante 30 min, y de bilis cada 10 min por un intervalo de 60 min.

A estas concentraciones de los colorantes utilizados, los sistemas de transporte hepático no se encuentran saturados.

Los estudios farmacocinéticos de manejo hepático de estos compuestos fueron llevados a cabo graficando la concentración plasmática de los mismos vs el tiempo luego de su administración. Las curvas obtenidas se ajustaron a una ecuación biexponencial del tipo:

$$C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot E \cdot e^{-\beta t}$$

Un intento preliminar de ajuste triexponencial no ofreció ninguna mejora en la calidad del ajuste de los datos, según se pudo juzgar aplicando los criterios de Akaike (173). Por lo tanto, el modelo de dos compartimientos (plasma e hígado) con un extremo biliar abierto, descrito por Richards y col. (174) fue considerado fisiológicamente adecuado para el análisis. Las constantes intrínsecas para el transporte de estos compuestos de plasma a hígado (captación hepática, r_{12}), de hígado a plasma (reflujo sinusoidal, r_{21}) y de hígado a bilis (excreción canalicular, r_3) fueron obtenidas como se describió previamente (174), de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$r_{12} = (A \cdot \alpha + B \cdot \beta) / (A + B)$$

$$r_3 = (\alpha \cdot \beta) / r_{12}$$

$$r_{21} = (\alpha + \beta) - (r_{12} + r_3)$$

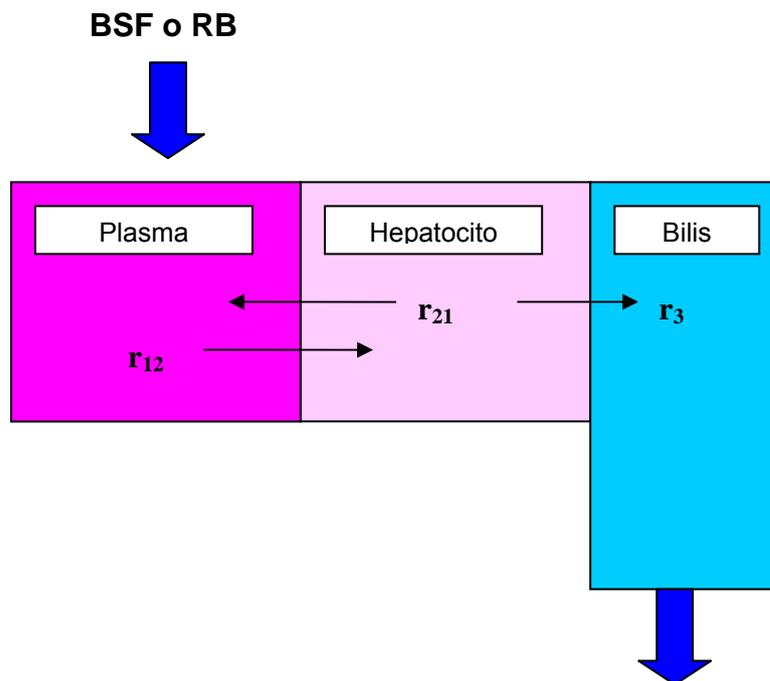


Fig 2.2 Modelo bicompartamental de transporte biliar descrito por Richards y col y constantes de transferencia derivadas del mismo (r_{12} : captación hepática, r_{21} : reflujo sinusoidal y r_3 : excreción canalicular).

3.5.3 Estimación del flujo biliar independiente de sales biliares (FBISB)

El valor del FBISB fue obtenido mediante extrapolación a cero de la recta de regresión obtenida al graficar FB vs velocidad de excreción de sales biliares (VESB) (62).

3.5.4 Actividad transportadora de Mrp2

La actividad transportadora del Mrp2 fue determinada administrando CDNB (1-cloro2, 4 dinitrobenceno en dosis de 10 μmol / Kg de peso corporal,

iv, en solución salina); el CDNB atravieza libremente la membrana sinusoidal, y es conjugado con glutation por el sistema de la Glutation S- transferasa, por lo que el derivado de GSH, dinitrophenyl-S-GSH (DNP-SG), es selectivamente excretado a la bilis usando como transportador el Mrp2. Luego de la administración de CDNB, fueron obtenidas muestras de bilis con intervalos de 10 min durante 60 min y fueron calculadas las velocidades de excreción biliar del DNP-SG como el producto del flujo biliar y la concentración biliar de DNP-SG medidas espectrofotométricamente a 335 nm.

3.6 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

3.6.1 Determinación de Aluminio en suero y tejidos

Las concentraciones de Al en suero y en tejidos constituyen marcadores de la exposición previa al metal.

El aluminio fue determinado por espectrometría de absorción atómica electrotrémica [horno de grafito y espectrómetro Perkin Elmer (5000)] en muestras de suero, hígado, riñón y mucosa intestinal de los animales de experimentación. Las muestras de tejido fueron pesadas inmediatamente de extraídas (200-1000 mg) con una precisión de 0.1 mg (balanza Mettler). A continuación en dichas muestras y en suero se procedió a su digestión con 1 ml de ácido nítrico concentrado de grado reactivo (Merck) en caliente, seguido de la disolución a 25 ml finales con agua ultrapura.

3.6.2 Determinación de parámetros bioquímicos marcadoras de daño hepático

Se midieron los niveles séricos de bilirrubina y las actividades de enzimas séricas marcadoras de daño hepatocelular, tales como la aspartato aminotransferasa (ASAT), la alanina aminotransferasa (ALAT) y la fosfatasa alcalina (FA). Estas determinaciones se realizaron utilizando equipos comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

3.6.3 Determinación de sales biliares totales

Las sales biliares totales en bilis fueron medidas por el método de la 3 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa (175). El método se fundamenta en la oxidación del grupo hidroxilo 3 alfa del núcleo de los ácidos biliares, en presencia de una enzima con la transferencia del hidrógeno liberado al NAD⁺ formando NADH. Se origina 1 mol de NADH por cada mol de ácido biliar oxidado. La determinación de NADH permite conocer la concentración de ácidos biliares hidroxilados en posición 3 alfa, configuración propia de los principales ácidos biliares fisiológicos.

3.6.4 Determinación de Glutation total (GSH)

Las muestras de bilis, recogidas en ácido sulfosalicílico al 6 %, fueron centrifugadas y el sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de glutatión total (reducido más oxidado), de acuerdo al método de Tietse (176).

3.6.5 Determinación de HCO_3^-

Las concentraciones de HCO_3^- en las muestras de bilis se calcularon a partir de los valores de pH y pCO_2 , utilizando la ecuación de equilibrio de Henderson/ Hasselbach. Los valores de pH y pCO_2 de la bilis fueron medidos inmediatamente después de su recolección, utilizando un analizador automático de gases en sangre.

3.6.6 Determinación de Bromosulfoftaleína (BSF)

La concentración de BSF en plasma y bilis fue determinada por medición espectrofotométrica a 577nm, efectuando una dilución previa de las muestras en NaOH 0,1 N. Para determinar las proporciones relativas de BSF libre y conjugada con GSH en bilis, se efectuó una cromatografía en capa delgada, utilizando gel de sílice como fase fija y una mezcla de acetona: agua: amoníaco (81:15:4) como fase móvil (177).

3.6.7 Determinación de Rosa de Bengala (RB)

La concentración de RB en plasma y bilis fue determinada por medición espectrofotométrica a 540 nm, efectuando una dilución previa de las muestras en agua destilada (172).

3.6.8 Determinación de proteínas totales

Para la determinación de las proteínas totales tanto en bilis como en homogenados hepáticos se utilizó el método de Lowry y Col (178).

3.6.9 Determinación de colesterol total

Se determinó la concentración de colesterol en bilis por el método enzimático de la colesteroleserasa, colesterol oxidasa y colesterol peroxidasa (Boehringer, Mannheim)

3.6.10 Determinación de fosfolípidos

Para la determinación de fosfolípidos totales se utilizó la técnica de Duck-Chong (179). El fósforo de los fosfolípidos es convertido primero en fosfato inorgánico, calentando el extracto lipídico en presencia de Nitrato de Magnesio. El residuo es disuelto en HCl. El fósforo inorgánico se determina por el reactivo ácido de molibdato-verde de malaquita con la formación de un

complejo entre fosfomolibdato y el colorante básico a pH bajo que se estabiliza con un tensoactivo. La absorbancia se mide a 650 nm, luego de 5 min a temperatura ambiente.

3.6.11 Niveles celulares de proteínas de transporte: Mrp2

Los niveles de Mrp2 se evaluaron por Western Blotting en membranas plasmáticas mixtas obtenidas por centrifugación diferencial, de acuerdo a la metodología descrita por Meier y col (180). Estas preparaciones de membrana fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de Na⁺ y sometidas a electroforesis. Luego, se transfirió la corrida a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Schleicher and Schuell, Keene, NH, EEUU), la cual fue incubada durante 1h con un anticuerpo monoclonal anti/Mrp2 de ratón (MC-206, Kamiya Biomedical Co, Seattle, WA, EE.UU) en una dilución 1:2000. El inmunocomplejo formado fue detectado mediante incubación durante 1 h con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rabanito (1:2000) (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EE.UU), previo bloqueo durante toda la noche con una solución salina amortiguada conteniendo Tris, 0,1% de Tween 20 y 5% de leche en polvo descremada. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando un equipo de quimioluminiscencia comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (RVL + Plus, Amersham Pharmacia Biotech Inc). Para ello, las membranas fueron expuestas a películas radiográficas Bio-Max MR-2 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU) durante 5 minutos y las bandas resultantes fueron cuantificadas, utilizando un

programa de análisis digital de imágenes (Gel-Pro Analyzer, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU).

3.6.12 Evaluación del metabolismo oxidativo en el tejido hepático

Al concluir el tratamiento los animales de los distintos grupos experimentales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso corporal), y previa extracción de sangre por punción intracardíaca y posterior sección de aorta, se removió rápidamente el hígado. Los mismos fueron lavados con solución fisiológica a 4°C. En homogenados de tejido hepático, se determinaron los contenidos de compuestos sulfhidrilos no proteicos (fundamentalmente glutation reducido- GSH), el grado de lipoperoxidación (LPO) y las actividades de enzimas antioxidantes, catalasa (CAT) y Glutation peroxidasa (GSH-Px).

3.6.13 Determinación de GSH reducido

La determinación de glutation se realizó en homogenados hepáticos obtenidos con tricloroacético al 5% en HCl 0.01M en frío, en una proporción de 4 ml por g de tejido, usando un homogenizador Potter-Elvehjén. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación y se determinó GSH según la técnica de Ellman (181) utilizando como reactivo el ácido 5,5'- ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

3.6.14 Determinación del grado de LPO

Como medida indirecta de la producción de sustancias O_2 reactivas se determinó el nivel de LPO por el método de Ohkawa (182). La determinación se realizó en homogenatos hepáticos preparados en una proporción de 1 g de tejido húmedo con 9 ml KCl 1,15%, usando un homogenizador Potter-Elvehjén. El método consiste en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con un producto secundario de la peroxidación lipídica, identificado como malondialdehído (MDA), formado durante la incubación de homogenados tisulares bajo condiciones aeróbicas, para producir en medio acético y en caliente, un cromógeno rojo con un pico de absorción espectrofotométrica a 532 nm. Los resultados se expresaron en nmol MDA/ g tejido húmedo.

3.6.15 Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas

La actividad enzimática de CAT fue determinada por el método de Beers y Sizer (183) y la de GSH-Px por el de Paglia y Valentine (184).

Para sus determinaciones se obtuvieron homogenados hepáticos con sacarosa 0,25 M, en una relación de 1 g por 9 ml, los cuales fueron luego centrifugados a 10000 g durante 20 minutos.

La actividad de CAT está basada en la cantidad de H_2O_2 degradada por la enzima, medida en buffer K_3PO_4 50mM con EDTA 0,1 mM, pH= 7,0. Fue medida espectrofotométricamente a 240 nm durante 60 segundos la

disminución en el contenido de agua oxigenada. La actividad de CAT fue expresada en unidades por mg de proteína.

La actividad de GSH-Px fue determinada utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato y la reacción fue seguida espectrofotométricamente por el consumo de NADPH por glutatión reductasa. La reacción fue realizada en buffer de fosfato 0,1 M pH= 7,0, con 1 mM GSH, 0,2 mM NADPH y 1,4 U de glutatión reductasa. Los cambios en la absorbancia fueron medidos durante 2 minutos a 340 nm. La actividad de GSH-Px fue expresada por nmol de NADPH/min. mg prot.

Para ambas enzimas, la concentración de proteínas en los homogenados fue determinada por el método de Lowry descrito en 3.6.8.

3.6.16 Determinación de la actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa (GST)

La determinación de la actividad de la enzima GST, se efectuó en la fracción citosólica, obtenida por centrifugación a 12000 g durante 12 minutos, de homogenados hepáticos con sacarosa 0,25M-EDTA 1mM (pH=7,4) en una relación de 1 g por 3 ml, de buffer. Luego se agregó al sobrenadante 0,2 volúmenes de CaCl₂ 0.1M y nuevamente se centrifugó 20 minutos a 12000 g. La actividad total de GST fue medida por el método de Habig (185). La formación de S-conjugados fue seguida espectrofotométricamente a 340 nm utilizando como sustrato 1-cloro 2, 4 dinitrobenzenceno (CDNB). La actividad fue expresada en nmol/min.mg prot.

3.7 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Los animales fueron sacrificados y sus hígados inmediatamente removidos. Muestras de diferentes lóbulos fueron fijadas en formol y procesadas histológicamente hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras de espesor que fueron montadas y coloreadas con Hematoxilina Eosina. Para evaluar la proliferación ductal se examinaron 50 áreas portales por cada animal y se determinó el número promedio de conductos biliares presentes en dicha región (NCB) (186). La fracción porcentual de volumen ocupada por áreas portales en el hígado entero fue medida en 5 secciones de hígado no seriadas bajo un aumento de 40X. En cada sección se observaron 10 campos microscópicos seleccionados al azar. Se utilizó el método estereológico de contaje de puntos y se expresó como densidad de volumen de áreas portales (V_{vap}) (187). Este parámetro morfométrico fue utilizado para detectar cambios patológicos debidos a proliferación ductal, inflamación portal y/o fibrosis portal. La inflamación del tracto portal (ITP) y la necrosis hepatocelular (NH) fueron determinadas semicuantitativamente utilizando el sistema de score descrito por Sokol et al (188). Se analizaron 5 secciones de hígado no seriadas. En cada sección fueron evaluados 10 campos microscópicos seleccionados al azar, calificándolos de 1 (ausencia o mínima) a 4 (máxima) de acuerdo a la magnitud de la necrosis hepatocelular y de la inflamación del tracto portal .

La fibrosis hepática (FH) fue cuantificada por análisis digital de secciones de tejido coloreadas con Direct Red 80 para colágeno (189). Con un

aumento de 40X, se determinó el porcentaje de área del hígado entero cubierta por fibras colágenas utilizando un software de análisis de imagen (Scion Imagen Beta 4.02 Scion Corporation, Frederick, Maryland). Las fibras colágenas que normalmente existen en el tracto portal o en vena central fueron también incluidas en la medición (190).

La cuantificación de apoptosis fue realizado por el método de TUNEL (Promega, Madison, WI, USA). Con un aumento de 400X, se analizaron al menos 6000 hepatocitos por sección. El índice apoptótico (IA) fue calculado para cada animal contando el número de células apoptóticas y cuerpos apoptóticos dividido por el número total de hepatocitos y expresado en porcentaje. Secciones seriadas teñidas con Hematoxilina Eosina fueron evaluadas para corroborar la incidencia de cuerpos apoptóticos y células apoptóticas (191).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores fueron expresados como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante Análisis de Variancia (ANOVA 2x2). Cuando las mismas mostraron diferencias significativas, se realizaron las comparaciones individuales a través de un test no paramétrico de Scheffé. Los valores con $P < 0.05$ fueron considerados con diferencias significativas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DE UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA A ALUMINIO SOBRE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

4.1.1 ESTUDIO DE DISTINTAS DOSIS EXPERIMENTALES DE ALUMINIO

4.1.1.1 Efecto del Al sobre el Peso corporal y hepático

Los animales tratados con Al, independientemente de las dosis analizadas (20,40 y 80 mg/ Kg pc), no mostraron signos biológicos evidentes de alteraciones toxicológicas, como asimismo no se registraron muertes de los mismos durante los 90 días de tratamiento experimental.

	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Peso del hígado (g)	Peso de hígado relativo (%)
Al (-)	337 ± 6	335 ± 6	12,3 ± 1,2	3,6 ± 0,3
Al(+) 20	321 ± 4	315 ± 3	13,1 ± 0,9	4,1 ± 0,2
Al(+) 40	324 ± 5	323 ± 6	12,5 ± 1,5	3,8 ± 0,2
Al(+) 80	328 ± 6	317 ± 4	11,8 ± 1,2	3,6 ± 0,1

Tabla 4.1 Efecto del tratamiento con aluminio sobre el peso corporal y hepático. Valores expresados como media ± SEM; n= 5 por grupo.

El análisis estadístico de los resultados muestra claramente que el tratamiento con Al no modifica el peso corporal ni el peso hepático al cabo de los 90 días coincidiendo con lo observado por otros autores (192). Como consecuencia de ello, el peso de hígado relativo, indicador de potencial hepatomegalia, no mostró cambios por la exposición a distintas dosis de Al.

4.1.1.2 Parámetros séricos de alteración hepática

La administración de aluminio provocó cambios significativos tanto en los niveles séricos de bilirrubina como en las actividades de las enzimas marcadoras de daño hepático evaluadas, siendo las mismas dosis dependientes. Sin embargo, sólo a niveles de 80 mg / Kg pc, dosis máxima estudiada, se observaron alteraciones significativas en los parámetros bioquímicos analizados (Tabla 4.2).

	ALAT (U / l)	ASAT (U / l)	FA (U / l)	Bb (μ M)
Al (-)	21,4 \pm 1,3 ^a	37,4 \pm 3,3 ^a	357 \pm 22 ^a	3,0 \pm 1,1 ^a
Al(+) 20	27,3 \pm 2,2 ^a	41,2 \pm 4,2 ^a	364 \pm 14 ^a	3,5 \pm 1,1 ^a
Al(+) 40	21,2 \pm 1,2 ^a	39,2 \pm 3,3 ^a	345 \pm 11 ^a	3,1 \pm 1,3 ^a
Al(+) 80	47,3 \pm 2,6 ^b	61,2 \pm 4,0 ^b	561 \pm 12 ^b	5,2 \pm 1,6 ^b

Tabla 4. 2 Efecto del tratamiento con distintas dosis de aluminio sobre algunos marcadores plasmáticos de función e integridad hepática. Valores expresados como media \pm SEM; n= 5 por grupo. Los resultados fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffé. Grupos de animales que no comparten el mismo supraíndice, son estadísticamente distintos a $p < 0.05$. Abreviaturas usadas: ALAT: alanina aminotransferasa; ASAT: aspartato aminotransferasa, FA: fosfatasa alcalina, Bb: bilirrubina.

4.1.1.3 Función secretora biliar

Como se puede observar en la Figura 4.1, el tratamiento de los animales con dosis crecientes de aluminio, indujo una disminución progresiva en los valores del flujo biliar (FB) y de la velocidad de excreción de sales biliares (VESB). Un efecto máximo fue alcanzado a la dosis de 80 mg/kg pc de Al, el cual llevó a una disminución del 23 % del FB y del 49% de la VESB.

Al comprobar que a la dosis de 80 mg de Al/ Kg pc se obtuvieron las máximas variaciones en los indicadores de función e integridad hepática, como también en el FB y VESB, se empleó la misma para la realización de los estudios posteriores. Es importante destacar que en la forma de exposición utilizada no se observaron en las ratas signos de alteraciones en el comportamiento, dolores, dificultades respiratorias, entre otros.

4.1.2 ACUMULACIÓN TISULAR DE ALUMINIO

Dada la ubicuidad del Al en el medio ambiente, la exposición de los animales a este elemento es inevitable, lo que estaría reflejado en los valores hallados en los grupos controles. Con el fin de establecer el grado de exposición al Al de los animales controles se efectuaron mediciones del contenido del metal en el agua de la red del suministro del bioterio y en el alimento proporcionado previa homogenización y disolución en HCl 0,1 N.

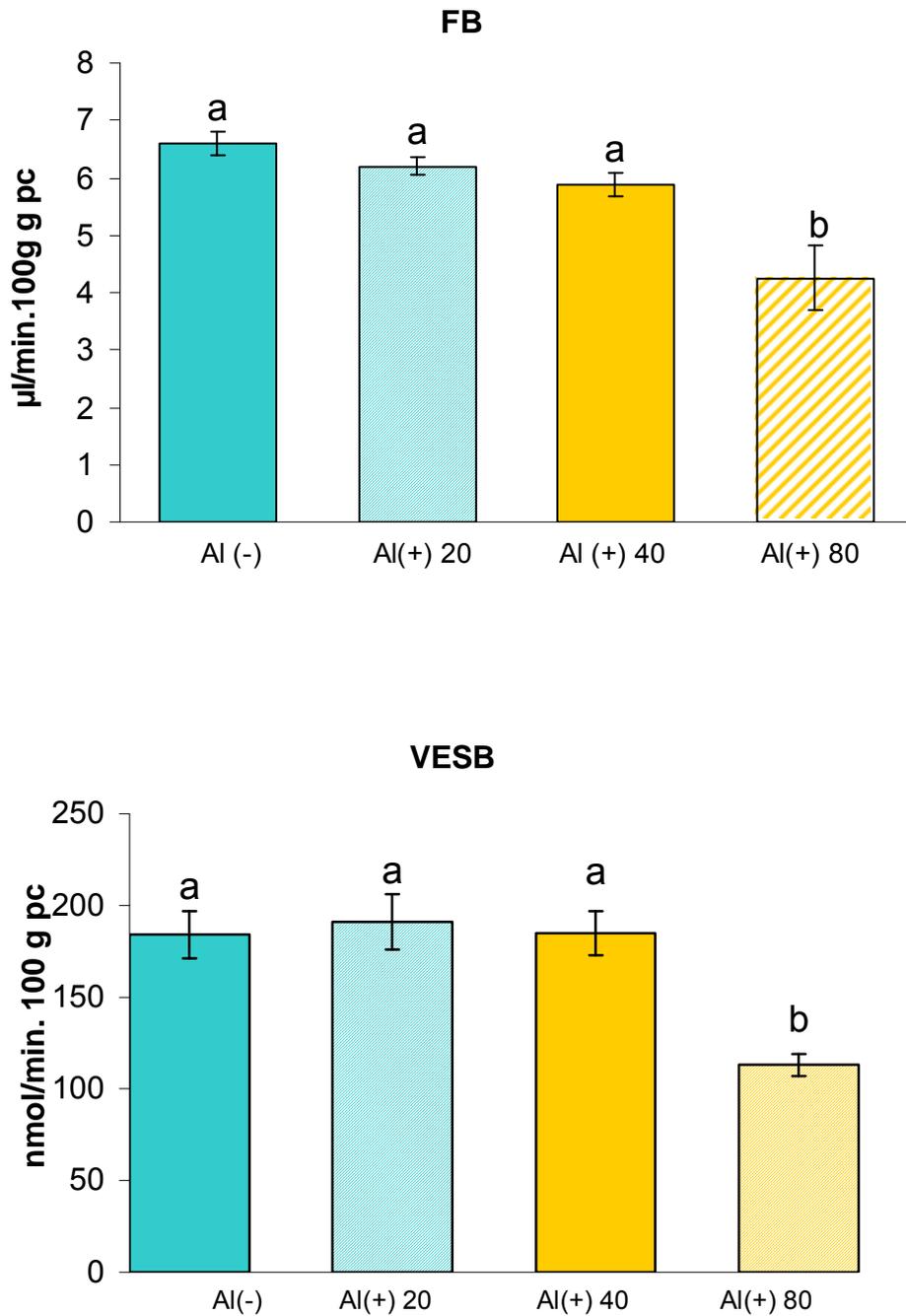


Figura 4.1. Efecto del tratamiento con Al sobre el flujo biliar y la velocidad de excreción de sales biliares. Valores expresados como media \pm SEM; n= 5 por grupo. Los resultados fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffé. Grupos de animales que no comparten la misma letra, son estadísticamente diferentes a $p < 0.05$. Abreviaturas usadas: FB, flujo biliar; VESB, velocidad de excreción de sales biliares.

El valor hallado en el agua (1 $\mu\text{mol/l}$) guarda relación con lo observado por otros autores: 0,37 a 7 $\mu\text{mol/l}$ (193) según el lugar de origen. En el alimento balanceado la concentración total de Al alcanzó un nivel de 36,3 $\mu\text{mol Al /g}$ de peso de alimento. El contenido de Al de las dietas comerciales para roedores, disponibles en otros países es significativamente más bajo. Se han reportado valores entre 2,5 a 10 $\mu\text{mol Al/ g}$ peso de alimento (193-197).

El contenido de Al en suero, riñón, hígado y mucosa intestinal en ratas adultas después de 90 días de tratamiento con hidróxido de aluminio, se presentan en la Tabla 4.3.

	Al (-)	Al (+)
Suero ($\mu\text{g/l}$)	9,1 \pm 4,2	750 \pm 50 *
Riñón ($\mu\text{g/g}$ tej. húmedo)	3,9 \pm 0,5	49.7 \pm 5.7*
Hígado ($\mu\text{g/g}$ tej. húmedo)	24,5 \pm 8,5	122,2 \pm 6.9*
Intestino ($\mu\text{g/g}$ tej. húmedo)	3,4 \pm 0,6	68,1 \pm 3,6*

Tabla 4.3. Contenido de aluminio en diferentes tejidos. Los resultados son expresados como la media \pm SEM. n= 6 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de student. * p< 0.001 vs el grupo Al (-).

Bajo las condiciones experimentales (tiempo, forma de administración) tanto en suero como en los tejidos donde se depositó el Al, las concentraciones de dicho catión aumentaron significativamente.

La exposición al aluminio por 90 días indujo un incremento significativo (aproximadamente de 4 veces) del contenido de aluminio hepático. Resultados

similares han sido reportados en estudios previos donde el Al fue administrado parenteralmente (197,198,56), a su vez esta acumulación ha sido asociada a la presencia de Al en las células gigantes hepáticas (197).

4.1.3 FUNCIÓN SECRETORA BILIAR

4.1.3.1 Alteraciones inducidas por el aluminio sobre la velocidad de excreción de componentes biliares

En la Tabla 4.4 se muestran el FB basal y la velocidad de excreción biliar de sus diferentes constituyentes luego de los 90 días de tratamiento con Al. En asociación a la disminución del FB observada a dosis de 80 mg/Kg pc, vemos que la velocidad de excreción biliar de proteínas, colesterol y sales biliares, fueron significativamente menores en el grupo Al (+) comparado con el grupo Al(-). Esta alteración estuvo relacionada a cambios en el FB y no a la concentración de dichos compuestos en bilis. Por otro lado, los niveles de fosfolípidos en bilis se incrementaron significativamente en los animales tratados con Al lo que compensó el descenso de FB, conduciendo a una normal velocidad de excreción biliar del mismo.

	Al (-)	Al (+)
Flujo biliar ($\mu\text{l} / \text{min} / 100\text{g pc}$)	6.60 \pm 0.20	4.25 \pm 0.56*
Velocidad de excreción biliar de Proteínas (mg / min100g pc)	21.00 \pm 0.70	13.10 \pm 1.30*
Velocidad de excreción biliar de fosfolípidos (nmol P / min100g pc)	32.90 \pm 1.40	35.20 \pm 3.30
Velocidad de excreción biliar de colesterol (nmol / min100g pc)	4.10 \pm 0.10	2.33 \pm 0.10*
Velocidad de excreción biliar de SB (nmol / min100g pc)	184.00 \pm 13.00	113.00 \pm 6.00*

Tabla 4.4. Efecto del tratamiento con Al en el flujo biliar y en la velocidad de excreción hepática de solutos biliares. Los parámetros fueron medidos en la bilis recolectada bajo condiciones basales. Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. n = 6 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * p < 0.05 vs el grupo Al (-).

La acumulación hepática de aluminio, fue acompañada por una disminución en el flujo biliar y en la secreción de sales biliares, las que actúan como fuerza impulsora primaria para la formación de la bilis, lo que sugeriría, que en parte, la disminución del flujo biliar pueda ser debida a una reducción en su fracción dependiente de ácidos biliares. Un resultado similar fue observado cuando el Al fue administrado subcrónicamente (i.e. por 14 días), intraperitonealmente (49). No obstante, cuando el Al fue dado enteralmente, se encontró baja acumulación del mismo en hígado hecho atribuido a la vía de administración empleada (50).

La función secretora biliar fue afectada 90 días luego de la administración de Al, datos que concuerdan con los reportados en una administración a corto tiempo (14 días) (49), indicando esta situación que

ningún mecanismo compensador se pone en juego luego de la exposición al Al para modificar las alteraciones en los mecanismos secretores biliares.

4.1.3.2 Alteraciones inducidas por el aluminio en el Flujo biliar independiente de sales biliares (FBISB)

Las gráficas de FB vs VESB nos permiten estimar tanto el FBISB como la eficiencia colerética. En ambos grupos experimentales se observa una significativa correlación entre dichas variables (R^2 ; Al(-): 0.9227 y Al(+): 0.9602 (Fig 4.2)

El FBISB, estimado por la ordenada al origen de las rectas de regresión de FB vs. VESB durante la infusión de taurocolato de sodio, fue disminuida significativamente por el Al (Al(-): $4.037 \pm 0.05 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ rata vs. Al(+): $1.679 \pm 0.032 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ rata; $p < 0.05$). El grupo tratado no modificó la eficiencia colerética de las SB excretadas a bilis, parámetro estimado por la pendiente de las rectas de regresión. El análisis de regresión arrojó las siguientes ecuaciones: Al (-): $y = 0.0157x + 4,037$ Al(+): $0.0165 x + 1.679$.

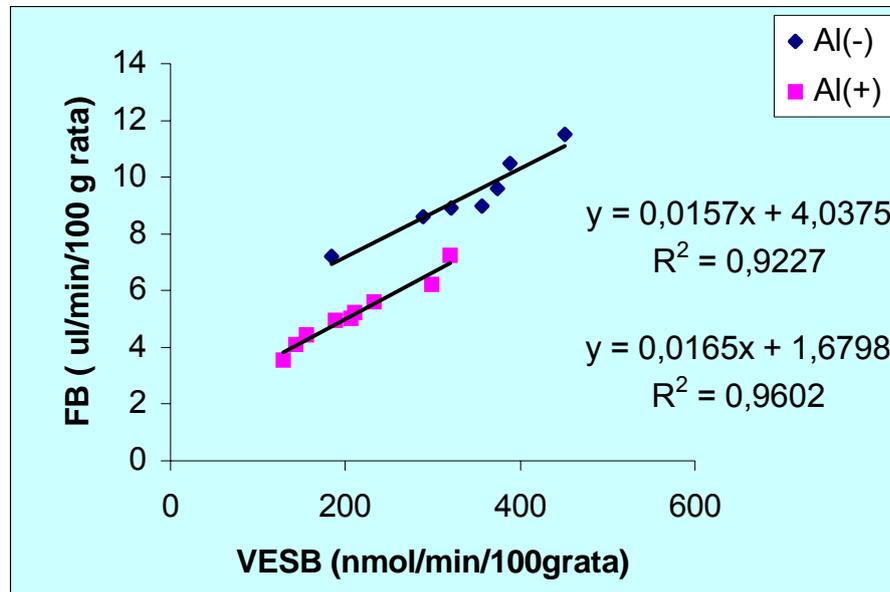


Fig 4.2 Relación entre el FB y la VESB obtenida mediante la infusión intravenosa de la sal biliar Taurocolato de sodio. Cada valor representa la media \pm SEM. $n= 8$ en cada grupo. El análisis estadístico de las ordenadas al origen y las pendientes de las rectas, fueron evaluadas a través de un test de Student *.

Ya que GSH y HCO_3^- han sido postulados como los principales determinantes de la fracción independiente del FB (62), evaluamos la excreción biliar de los mismos en nuestro modelo. Como se observa en la Fig 4.3, la velocidad de excreción biliar de ambos compuestos fueron significativamente disminuidos con el tratamiento de AI.

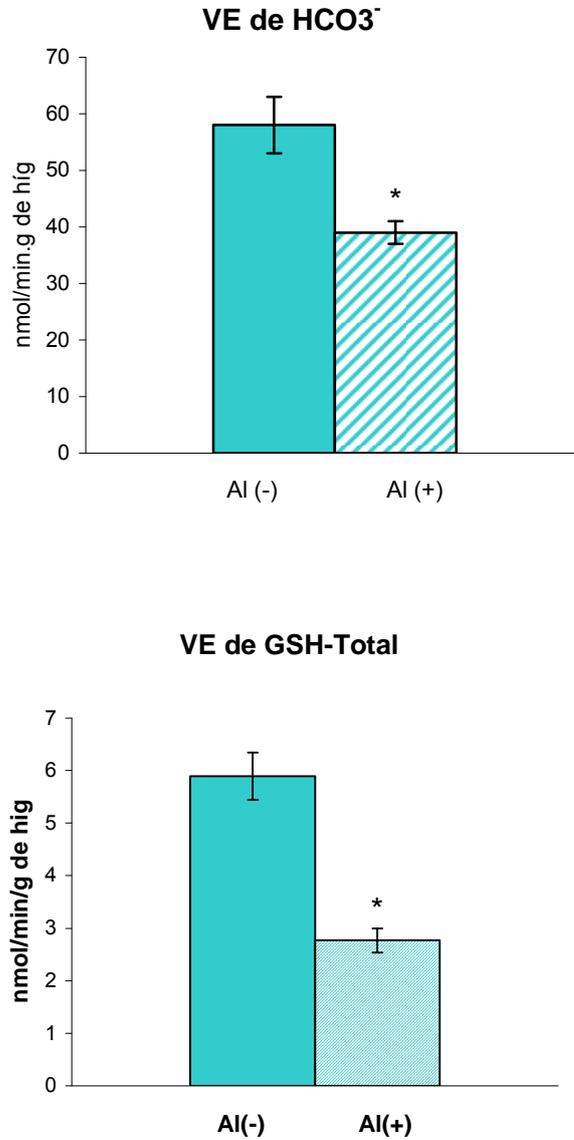


Fig 4.3 Efecto del tratamiento con aluminio sobre la excreción biliar de HCO₃⁻ y GSH. Cada valor representa la media ± SEM. n= 8 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * p< 0.001 vs el grupo Al (-).

4.1.3.3 Efecto del Aluminio sobre el transporte hepático del anión orgánico colefílico Bromosulfoftaleína (BSF)

Las alteraciones en la función secretora biliar inducidas por la intoxicación con Al han sido evaluadas previamente (49), pero no existen datos sobre los cambios inducidos por el Al en el transporte hepático de aniones orgánicos. Esta información es altamente relevante, ya que, estos sistemas de transporte están involucrados en la eliminación biliar de compuestos potencialmente tóxicos, endo-xenobióticos, incluyendo bilirrubina, sales biliares glucuronizadas o sulfatadas, leucotrienos, C4, medicamentos y numerosos constituyentes dietarios (199,200).

El efecto del Al sobre los sistemas de transporte canalicular fue estudiado *in vivo*, a través del manejo hepático del anión orgánico Bromosulfoftaleína (BSF), compuesto colorante relativamente no tóxico, que es comúnmente utilizado como indicador de la función hepática. Con este propósito, fue realizado el análisis farmacocinético de la desaparición plasmática del colorante, el cual proporciona una estimación cuantitativa de la eficiencia de los eventos por los cuales los transportadores están funcionando en el hepatocito *in vivo*. La BSF es selectivamente captada por el hepatocito a través de un mecanismo transportador independiente de Na (perteneciente a una familia [Oatp] de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos) y es conjugada con Glutathion (GSH) dentro del hepatocito por la enzima Glutathion S-transferasa (GST). Luego, es subsecuentemente excretado a la bilis por el

transportador canalicular multiespecífico ATP-dependiente, Mrp2 (52) paso limitante en la transferencia global plasma-bilis (201).

Los diferentes parámetros, clearance plasmático (Cl_p), tiempos de vida media para las fases rápida ($T_{1/2\alpha}$) y lenta ($T_{1/2\beta}$) de decaimiento plasmático y las velocidades de transferencia intrínseca, r_{12} (captación hepática), r_{21} (eflujo sinusoidal) y r_3 (excreción canalicular) fueron obtenidos a partir del análisis biexponencial de parámetros de decaimiento plasmático, de acuerdo a fórmulas Standard para un modelo abierto de dos compartimientos (ver material y métodos).

El tratamiento con AI redujo significativamente el clearance plasmático de la BSF (-59%), el cual fue acompañado por una significativa reducción en la velocidad fraccional de captación (r_{12} -53%) y de excreción (r_3 -43%) del colorante (Tabla 4.5). Las alteraciones en estas etapas del transporte, particularmente las alteraciones en la transferencia canalicular del colorante r_3 (que es la velocidad limitante en la transferencia global de la BSF desde sangre a bilis), explica el decrecimiento en la excreción total del mismo. Una clara tendencia a disminuir existe en la velocidad fraccional de reflujo hepático, pero, debido a la alta variabilidad interindividual, la diferencia no marca significancia estadística. El decaimiento plasmático del colorante BSF, fue menor en el grupo AI(+). Esto estuvo relacionado con el incremento de los valores del tiempo de vida medio para las fases rápida y lenta del decaimiento plasmático.

	Al (-)	Al (+)
Cl_p (ml/Kg p.c)	1,7 ± 0,6	0,7 ± 0,2*
r_{12} (min ⁻¹)	0.136 ± 0.010	0.064 ± 0.008*
r_{21} (min ⁻¹)	0.030 ± 0.007	0.013 ± 0.005
r_3 (min ⁻¹)	0.058 ± 0.007	0.032 ± 0.006*
$T_{1/2 \alpha}$ (min)	2 ± 0,6	6,6 ± 1,4*
$T_{1/2 \beta}$ (min)	25 ± 4	47 ± 8 *
V_d (ml/Kg p.c)	62 ± 7	68 ± 5

Tabla 4.5. Efectos del tratamiento con aluminio sobre los parámetros farmacocinéticos derivados del Análisis Bicompartimental del decaimiento plasmático del colorante Bromosulfoftaleina. Abreviaturas: clearance plasmático (Cl_p); velocidades de transferencia intrínseca, r_{12} (captación hepática), r_{21} (eflujo sinusoidal) y r_3 (excreción canalicular); tiempos de vida media para las fases rápida ($T_{1/2 \alpha}$) y lenta ($T_{1/2 \beta}$) de decaimiento plasmático de BSF.; Volumen de distribución (V_d). Los valores fueron expresados como la media ± SEM. n = 6 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un tesr de Student. * p< 0.001 vs el grupo Al (-).

4.1.3.4 Efecto del aluminio sobre la actividad de la glutathion-S-transferasa (GST)

Dado de que los estudios farmacocinéticos del transporte de BSF se mostraron alterados por la exposición al Al, se procedió a estudiar la actividad

de GST, enzima implicada en la fase II de detoxificación hepática. Esta enzima específicamente está comprometida en las reacciones de conjugación de compuestos, como los colorantes colefílicos, en el interior del hepatocito. Interviene en la conjugación de la BSF con GSH originando conjugados GSH-BSF que pueden sufrir distintas transformaciones para ser eliminados (202,203) y son excretados a la bilis por el transportador canalicular multiespecífico ATP-dependiente Mrp2 (52).

El análisis estadístico de los resultados muestra claramente que el tratamiento de 90 días con AI disminuyó significativamente la actividad de la GST (Fig 4.4). La disminución en los niveles de GST observados podría explicar la reducción en la velocidad de transferencia canalicular r_3 .

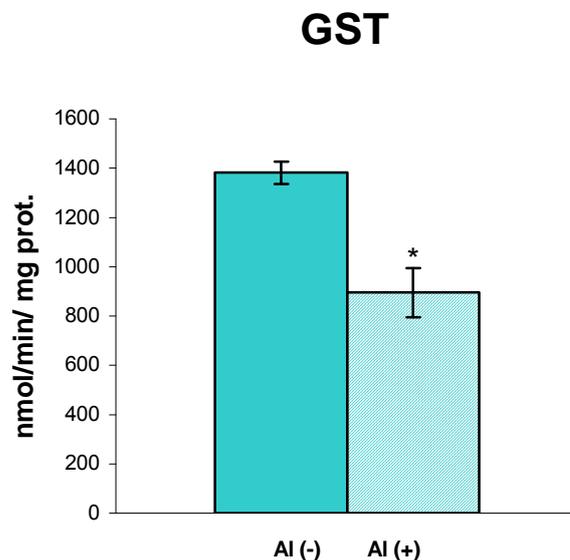


Fig. 4.4 Actividad de la enzima Glutation- S – transferasa medida en homogenados hepáticos de los dos grupos experimentales AI(-) y AI (+). Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. $n = 6$ en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * $p < 0.05$ vs el grupo AI (-).

Al respecto, otros autores (203,204) han encontrado en intoxicaciones agudas con Al, disminución de la actividad enzimática de citocromo P450 y GST.

4.1.3.5 Efecto del Aluminio sobre la excreción de BSF

Se analizó la excreción biliar de BSF en sus formas total, libre y conjugada. Como muestra la Tabla 4.6 el tratamiento durante 90 días con Al disminuyó la excreción biliar total de BSF. Este efecto pareciera no ser dependiente de la conjugación, dado que la excreción del colorante en sus formas libre y conjugada se altera en forma semejante.

	Al (-)	Al (+)
BSF total excretada (mg/60 min/g hígado)	1258 ± 105	909 ± 19 *
BSF libre excretada (mg/60 min/g hígado)	221 ± 6	136 ± 25 *
BSF conjugada excretada (mg/60 min/g hígado)	1036 ± 68	773 ± 39 *

Tabla 4.6. Efectos del tratamiento con Al sobre la excreción biliar de BSF. La BSF total, libre y conjugada fue expresada como la cantidad de colorante excretado a lo largo del periodo de recolección de bilis. Los valores fueron expresados como la media ± SEM n = 6 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * p < 0.05 vs el grupo Al (-).

Esta ausencia de alteraciones significativas en la relación BSF conjugada sobre total sugeriría que los cambios en la conjugación intrahepática de la BSF, un paso metabólico que facilita su transferencia canalicular (205), parecerían no estar implicados en la alteración del paso del colorante a bilis, coincidiendo en lo observado en la relación BSF conjugada / BSF total donde no se produjeron cambios significativos.

4.1.3.6 Efecto del Aluminio sobre el transporte hepático del anión orgánico colefílico Rosa de Bengala (RB)

Debido a los resultados obtenidos y para descartar definitivamente la implicancia de la conjugación, se procedió a utilizar otro colorante, el RB, que no es metabolizado durante su tránsito a través del hepatocito (172). El mismo es captado por el hepatocito a través de un mecanismo transportador independiente de Na (perteneciente a una familia Oatp de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos) y luego subsecuentemente es excretado a la bilis por el transportador canalicular multiespecífico ATP-dependiente Mrp2 (52) paso limitante en la transferencia global plasma-bilis (107). Los diferentes parámetros farmacocinéticos indicadores de la dinámica de metabolización del RB, clearance plasmático (Cl_p), tiempos de vida media para las fases rápida ($T_{1/2 \alpha}$) y lenta ($T_{1/2 \beta}$) de decaimiento plasmático y las velocidades de transferencia intrínseca, r_{12} (captación hepática), r_{21} (eflujo sinusoidal) y r_3 (excreción canalicular) fueron obtenidos de igual manera que para el colorante BSF.

El análisis farmacocinético indicó que tanto el clearance como las velocidades de transferencia fraccional para el transporte del colorante desde el plasma al hígado (r_{12}) y desde el hígado a la bilis (r_3), fueron alterados por la administración de Al (Tabla 4.7).

	Al (-)	Al (+)
Cl_p (ml/Kg p.c)	1.54 ± 0.5	$0.52 \pm 0.03^*$
r_{12} (min^{-1})	0.120 ± 0.008	$0.045 \pm 0.007^*$
r_{21} (min^{-1})	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.005
r_3 (min^{-1})	0.029 ± 0.003	$0.005 \pm 0.0001^*$
$T_{1/2 \alpha}$ (min)	5.9 ± 0.3	$11.4 \pm 1.3^*$
$T_{1/2 \beta}$ (min)	23 ± 3	$56 \pm 8^*$
V_d (ml/Kg p.c)	64 ± 3	66 ± 5

Tabla 4.7. Efectos del tratamiento con aluminio sobre los parámetros farmacocinéticos derivados del análisis bicompartamental del decaimiento plasmático del colorante Rosa de Bengala. Abreviaturas: clearance plasmático (Cl_p): velocidades de transferencia intrínseca, r_{12} (captación hepática), r_{21} (eflujo sinusoidal) y r_3 (excreción canalicular); tiempos de vida media para las fases rápida ($T_{1/2 \alpha}$) y lenta ($T_{1/2 \beta}$) de decaimiento plasmático de RB; volumen de distribución (V_d). Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. $n = 6$ en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student * $p < 0.001$ vs el grupo Al (-).

Los elevados tiempos de vida media de las fases rápida y lenta, como fuera observado para la BSF, fueron indicativos de alteraciones en el decaimiento plasmático del RB.

Los estudios farmacocinéticos realizados demuestran que la transferencia canalicular, paso limitante en la transferencia global plasma – bilis de BSF y RB, fueron significativamente alterados por el tratamiento con Al. Esto condujo, entonces, a estudiar tanto los niveles celulares como la función transportadora del Mrp2, transportador canalicular más importante involucrado en el proceso de excreción biliar.

4.1.3.7 Efecto del Aluminio sobre los niveles celulares y la actividad del transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico, Mrp2

El Al induce, en la forma y tiempo utilizado, una disminución de los niveles de Mrp2 de un 40% (Fig. 4.5). La actividad transportadora de esta proteína fue evaluada *in vivo* por el análisis de la excreción biliar del sustrato específico de Mrp2, dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG). Este sustrato es producido intracelularmente por conjugación del cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB), el cual atraviesa libremente la membrana sinusoidal, con GSH, mediado por la enzima GST. Por cierto, el Mrp2 media la secreción canalicular de GSH una llave determinante del FBISB (123).

Este estudio independiza los cambios en la actividad transportadora basolateral sobre los procesos secretorios, por lo que la excreción biliar del

DNP-SG reflejará tanto la actividad de conjugación de la GST como la eficiencia transportadora del Mrp2.

En la Fig 4.6 podemos observar que el AI redujo la excreción biliar del DNP-SG. Como consecuencia de esto, tanto el pico de la excreción biliar de DNP-SG como su excreción biliar acumulada, a lo largo del periodo experimental, disminuyó en un 50% comparada con el grupo AI(-). Sin embargo, tal como se analizó anteriormente, aunque la actividad de conjugación de la GST respecto del CDNB, fue disminuida en un 35%, los cambios en la conjugación de CDNB no pueden explicar completamente la disminución en la excreción del DNP-SG.

Por lo tanto, la alteración en la transferencia canalicular de los colorantes estudiados ocurriría mayormente debido a la alteración en la actividad o en el contenido de su transportador canalicular, Mrp2. El análisis del Western Blot y la alteración en la actividad funcional del Mrp2, confirman esta hipótesis. Los niveles hepáticos de Mrp2, disminuyeron en el grupo AI (+), lo cual fue acompañado por un decrecimiento en la excreción del sustrato específico de Mrp2, Dinitro fenil glutation (DNF-SG).

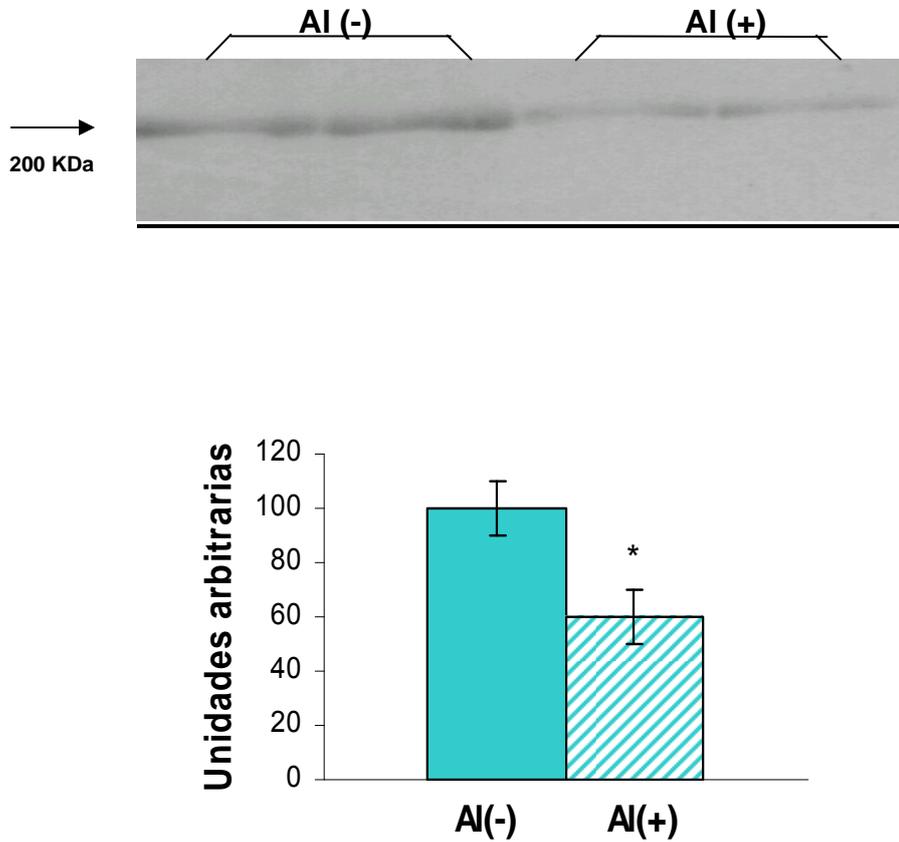


Fig 4.5 En el panel superior: Western blotting del contenido de la proteína Mrp2 en membrana plasmática total de hígados de los grupos AI(-) y AI(+). Panel inferior: Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Mrp2 en los grupos AI(-) y AI(+). Los valores fueron expresados como la media \pm SEM n = 6 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student * p< 0.001 vs el grupo AI (-).

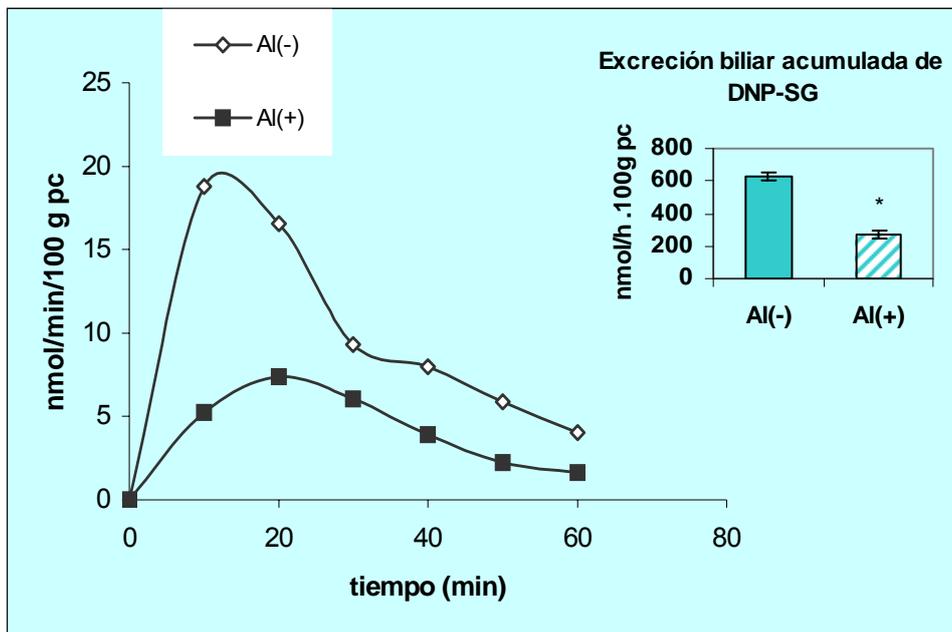


Fig 4.6 Efectos del aluminio sobre la velocidad de excreción biliar del DNP-SG. El gráfico inserto muestra la excreción acumulada de DNP-SG a lo largo de todo el período experimental en los grupos Al(-) y Al(+). Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. $n = 6$ en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * $p < 0.001$ vs el grupo Al (-).

4.1.4 EFECTOS DEL AI SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO HEPÁTICO

Se examinaron marcadores de estrés oxidativo: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión reducido (GSH) y las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT).

Los resultados mostraron evidencias de daño oxidativo en homogenados hepáticos de los animales tratados con Al. Cuando concluyeron los 90 días de tratamiento con Al el contenido de TBARS en los homogenados hepáticos,

obtenido como medida de la lipoperoxidación *in vivo*, se encontró significativamente aumentado (Fig 4.6). Estos datos obtenidos, muestran una posible relación entre el estrés oxidativo y la hepatotoxicidad producida por el Al.

Por otra parte, en el grupo Al(+) existe una disminución significativa en el contenido de GSH hepático acompañado por una disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y GSH-Px (Fig 4.6). Esto sugiere que la toxicidad del Al podría estar mediada además, por su acción inhibitoria sobre la actividad de enzimas antioxidantes. La inhibición de la actividad GSH-Px y CAT podría llevar a la acumulación de compuestos intermediarios tóxicos tales como el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. El efecto inhibitorio del Al sobre la enzima CAT podría ser directo, o bien por el reemplazo del Fe de su sitio activo por el Al, ya que los radios iónicos de ambos cationes son similares (205).

A diferencia de otros metales el Al no tiene afinidad por los grupos sulfhidrilos y no se conjuga con GSH, como lo hace el mercurio por lo que la reducción observada en el contenido de GSH luego de los 90 días de tratamiento, podría deberse a un exceso de oxidaciones, a un aumento de su *turnover*, o a una reducción en su síntesis. Evidencias experimentales sugieren que la LPO está implicada en el mecanismo de toxicidad de distintos xenobióticos y de agentes que reducen el glutatión. En nuestro caso la acumulación de Al a nivel tisular, podría desencadenar estrés oxidativo evidenciado por el aumento de la LPO, que sería responsable de la reducción

en los niveles de GSH. Estos datos serían indicativos de que el AI actuaría como pro-oxidante a nivel hepático.

Nuestros resultados están en concordancia con otros estudios mostrando que dosis menores de AI (i.p.) y más cortos periodos de administración inducen un aumento significativo en especies reactivas al oxígeno en hígado (57). Los efectos están asociados a una disminución en los niveles de las defensas antioxidantes incluyendo GSH (57,56), CAT (57), GSH-Px (56).

La baja actividad de la GST descrita anteriormente, podría ser otro factor de contribución al aumento de la LPO, dado que esta enzima cumple un rol importante en la detoxificación de hidroperóxidos lipídicos (55).

A través de estos estudios realizados, se puso en evidencia que el AI es capaz de inducir a nivel hepático estrés oxidativo. Estos incluyen cambios en los niveles de antioxidantes, tales como CAT y GSH-Px, así como un elevado nivel de TBARS. Esto fue acompañado de una reducción de GSH, así como en la actividad de GST.

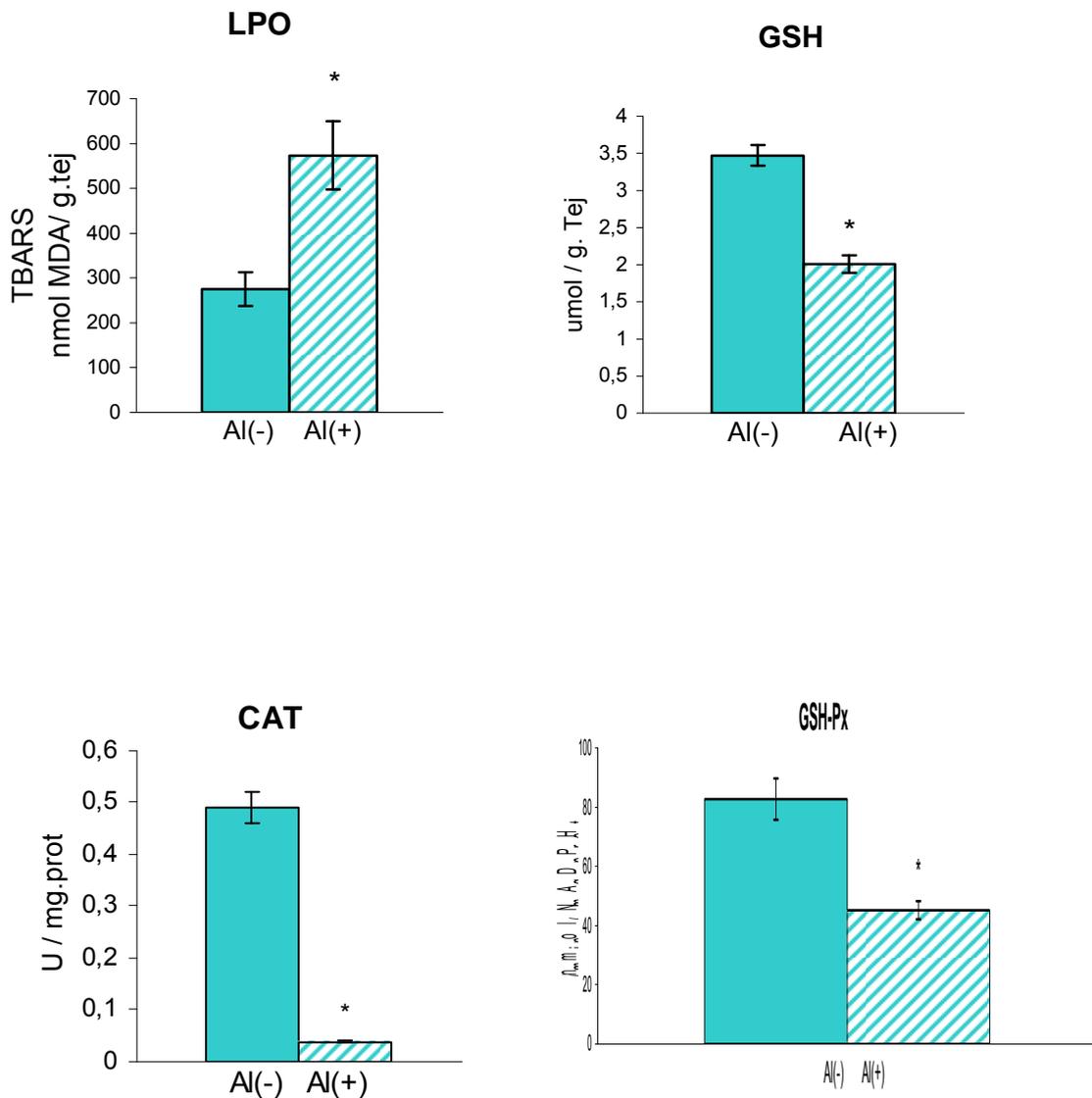


Fig 4.6. Peroxidación lipídica (LPO) ; Contenido de sulfhidrilos no proteicos (GSH) ; Actividad de las enzimas antioxidantes Catalasa (CAT) y Glutation Peroxidasa (GSH-Px) en homogenados hepáticos medidos en animales de los grupos AI(-) y AI(+). Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. n = 6 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * p< 0.05 vs el grupo AI (-).

4.1.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las características histológicas de la hepatotoxicidad inducida por el Al reveladas por los estudios realizados, indican que el metal induce tanto apoptosis como necrosis hepatocelular (Tabla 4.8).

Las imágenes histológicas de ratas tratadas y no tratadas con Al se muestran en la Fig 4.7 y 4.8. Se puede observar una significativa necrosis hepatocelular con proliferación de los ductos y fibrosis. Se observa además, un aumento del volumen de áreas portales con significativo infiltrado inflamatorio principalmente linfocitario. Los cuerpos apoptóticos se encuentran distribuidos uniformemente en el tejido.

4.1.5.1 Índice de apoptosis y necrosis

Nuestros resultados (Tabla 4.8) nos muestran un aumento significativo del índice apoptótico (IA) y de necrosis hepatocelular (NH) en los animales tratados crónicamente con Al.

	AI(-)	AI(+)
IA	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.007*
NCB	1.20 ± 0.019	2.43 ± 0.11*
ITP	1.0 ± 0.001	2.4 ± 0.13*
V_{VAP}	1.33 ± 0.03	4.93 ± 0.42*
FH	0.62 ± 0.06	1.18 ± 0.12*
NH	1.00 ± 0.00	2.13 ± 0.09*

Tabla 4.8. Parámetros histológicos en preparados de hígado de ratas de los grupos AI (-) y AI (+). IA: Índice de apoptosis celular expresados como el porcentaje de células y cuerpos apoptóticos contados en 6000 hepatocitos por preparado. NCB: Número promedio de conductos biliares en áreas portales. ITP: Inflamación en tracto portal expresados adimensionalmente desde 1 (ausencia o mínimo) a 4 (máximo). V_{VAP}: Densidad de volumen de áreas portales en el hígado entero expresada como porcentaje. FH: Fibrosis hepática evaluada como el porcentaje de área del hígado entero ocupada por fibras colágenas. NH: Necrosis hepatocelular expresada adimensionalmente desde 1 (ausencia o mínimo) a 4 (máximo). Los valores son expresados como la media ± SEM. n = 4 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * p< 0.05 vs el grupo AI (-).

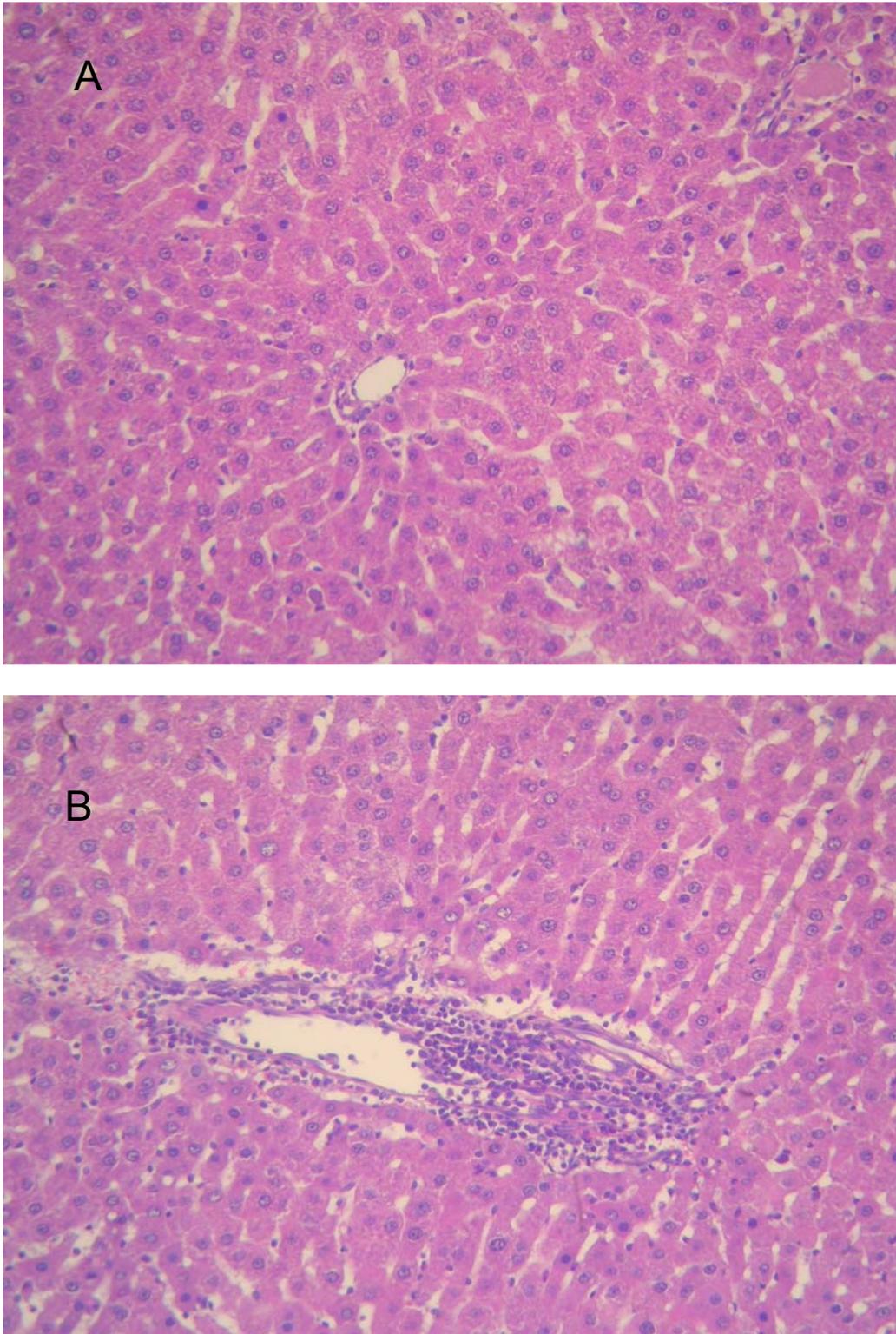


Figura 4.7 Histología representativa de hígados de ratas perteneciente a: (A) grupo Al (-); (B) hígado de ratas crónicamente expuestas al aluminio (H&E; original magnification X200).

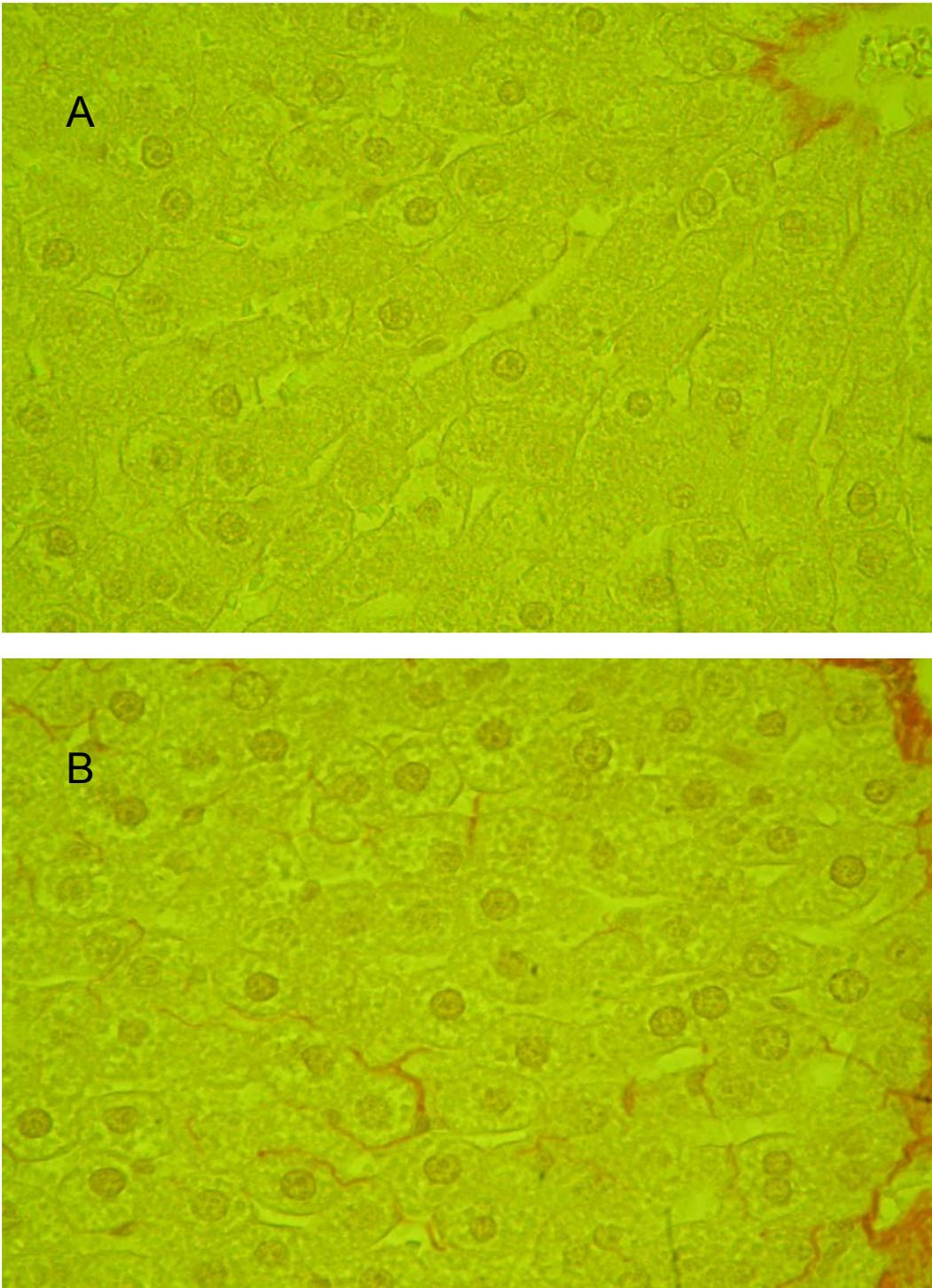


Figura 4.8 Histología representativa de hígados de ratas perteneciente a: (A) grupo AI (-); (B) hígado de ratas crónicamente expuestas al AI . Coloración: 1% Rojo sirio-ácido pícrico 80 para colágeno.

Ha sido demostrado que el Al induce apoptosis en tejido cerebral (206,207), el cual ha sido asociado con desórdenes neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (208). En el tejido cerebral, la apoptosis ocurre vía alteración mitocondrial donde, el Al acumulado en mitocondrias neuronales, inhibe el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La excesiva acumulación de calcio mitocondrial induce, en parte, la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial, con liberación de citocromo C y la consecuente apoptosis, resultando la activación de las caspasas. Además, se demostró que el Al induce en cerebro una estimulación de la expresión de una proteína pro-apoptótica (Bax), que exagera la liberación desde mitocondria del citocromo C, y una inhibición de la expresión de una proteína anti-apoptótica (Bcl-2), que estabiliza la membrana mitocondrial (208,209). Si estos mecanismos ocurren en células hepáticas, el estrés oxidativo sería el efector en un mecanismo de retroalimentación positivo, haciendo la mitocondria más susceptible a formar poros de transición de permeabilidad, apoptosis y por ende, más estrés oxidativo. Bajo esta hipótesis, a medida que estos mecanismos patológicos continúen, podría estar ocurriendo una mayor disfunción mitocondrial y una mayor depleción de ATP que finalmente conduciría a necrosis. Así ocurriría tanto apoptosis como necrosis (209). Esto puede explicar las alteraciones hepatocelulares observadas.

4.2 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL ALUMINIO

Los resultados encontrados y discutidos en 4.1, nos permiten hipotetizar que el estrés oxidativo podría jugar un rol clave en el desarrollo de las alteraciones colestásicas provocadas por el tratamiento crónico con Al. Para evaluar esta hipótesis se investigó la posible relación existente entre el estrés oxidativo y la función secretora biliar, mediante la prevención del daño oxidativo inducido por la intoxicación crónica con Al por el antioxidante Vit E (210). Esta vitamina liposoluble se acumula en membranas celulares y protege de la acción de los peróxidos lipídicos, superóxidos y radicales libres hidroxilos (211). Este antioxidante fue seleccionado porque fue usado en forma muy satisfactoria para prevenir el estrés oxidativo hepatocelular inducido por el Lactato de Al en un modelo de intoxicación corta de 4 semanas (57).

4.2.1 EFECTO DE LA VITAMINA E SOBRE EL CONTENIDO DE Al EN PLASMA Y TEJIDO HEPÁTICO

Como pudimos observar anteriormente, el tratamiento con Al conduce a una acumulación hepática de dicho elemento en el hígado. El análisis individual de los grupos muestra que la Vit E previno parcialmente la acumulación plasmática y hepática del metal en un 40 y 44 % respectivamente (Fig. 4.9).

La reducción del contenido de Al que ocurre como una consecuencia de la co-administración de Vit E, si bien puede representar un factor de contribución, es improbable que ocurra enteramente por su efecto preventivo.

Resultados y Discusión

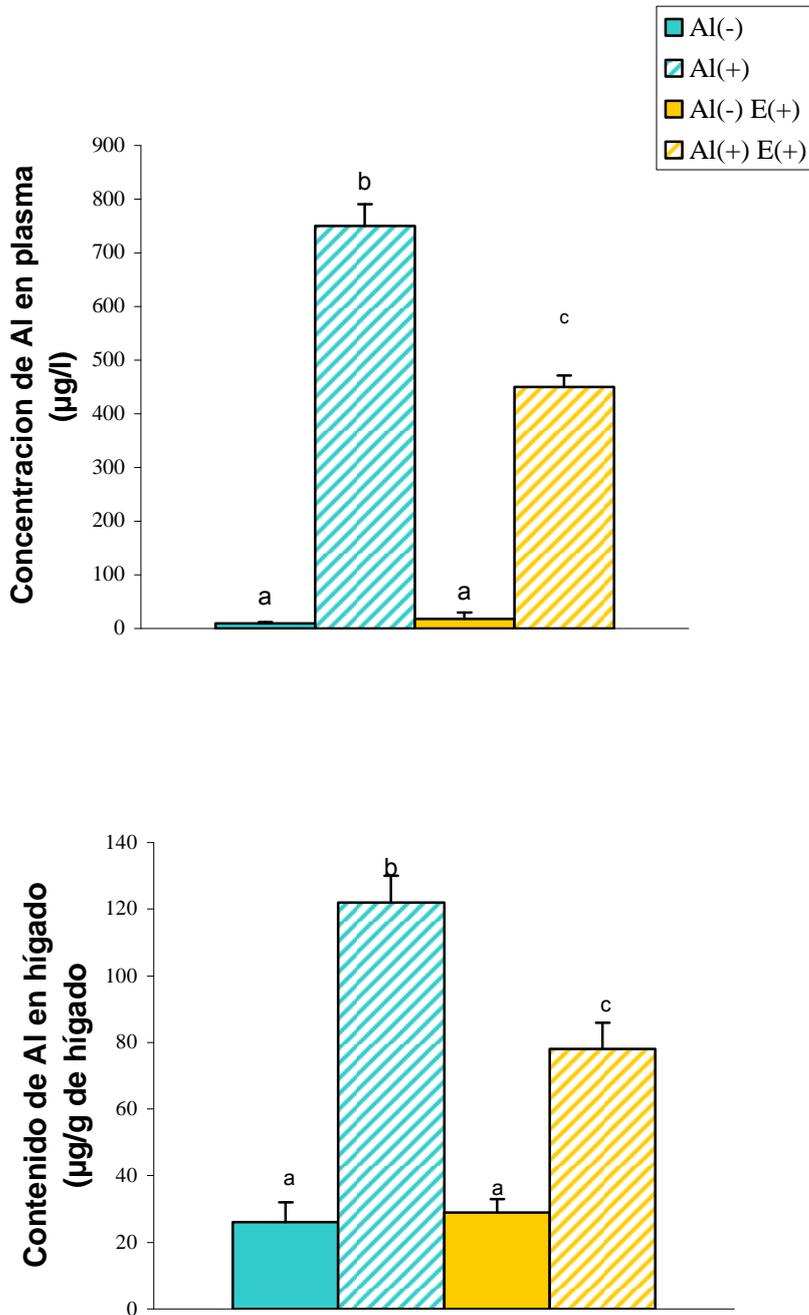


Fig.4.9 Contenido de Al en plasma y tejido hepático. Los resultados son expresados como la media \pm SEM. $n=6$ en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffe. Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

4.2.2 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE LA SECRECIÓN BILIAR

4.2.2.1 Efecto Preventivo de la vitamina E sobre el flujo biliar

Como demostramos anteriormente, el aluminio induce colestasis cuando es administrado crónicamente. Esto se hizo evidente por la reducción del flujo biliar, efecto asociado a una disminución en la excreción canalicular de aniones orgánicos, una llave determinante en la formación del flujo biliar.

El efecto preventivo de la Vit E sobre las alteraciones en el FB ocasionadas por el Al son mostradas en la Tabla 4.8. El análisis de variancia muestra un significativo efecto del Al ($p < 0.01$) y de la vitamina E ($p < 0.01$). Cuando se analiza el efecto conjunto de ambos tratamientos observamos que la Vit E previno las alteraciones ocasionadas por el Al.

	Al(-)	Al(+)	Al(-) E(+)	Al(+) E(+)
Flujo biliar ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ p.c)	6.56 ± 0.22^a	4.39 ± 0.51^b	6.42 ± 0.16^a	6.51 ± 0.18^a

Tabla 4.8. Efecto de la Vit E sobre los cambios inducidos en el Flujo biliar por el tratamiento con Al. El flujo biliar fue recolectado bajo condiciones basales. Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. $n = 6$ en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffe. Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

Los análisis estadísticos para ponderar los efectos individuales, nos muestran que las velocidades de excreción de los componentes de la bilis alteradas por el tratamiento con AI, se encontraron dentro de los parámetros de normalidad (Tabla 4.9). Esto evidencia claramente el efecto preventivo que la Vit E ejerce al administrarse simultáneamente con el AI.

	AI (-)	AI (+)	AI (-)E(+)	AI (+)E(+)
Velocidad de excreción biliar de proteínas (mg/min.100g pc)	24.00 ± 0.70 ^a	13.10 ± 1.30 ^b	24.18 ± 1.00 ^a	20.13 ± 0.80 ^a
Velocidad de excreción biliar de fosfolípidos (nmol P/min.100g pc)	33.12 ± 1.40 ^a	36.20 ± 3.30 ^a	33.01 ± 1.30 ^a	32.10 ± 2.30 ^a
Velocidad de excreción biliar de colesterol (nmol/min.100g pc)	4.56 ± 0.10 ^a	2.61 ± 0.10 ^b	3.10 ± 0.30 ^a	4.10 ± 0.80 ^a
Velocidad de excreción biliar de SB (nmol/min.100g pc)	186.0 ± 13.0 ^a	118.0 ± 6.0 ^b	179.10 ± 9.12 ^a	181.10 ± 11.30 ^a

Tabla 4.9. Efecto de la Vit E sobre los cambios inducidos por el tratamiento con AI en la velocidad de excreción hepática de solutos biliares. Los parámetros fueron medidos en la bilis recolectada bajo condiciones basales. Los valores fueron expresados como la media ± SEM. n = 6 en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffe. Valores que no compartan el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de p < 0,05.

4.2.2.2 Efecto preventivo de la Vitamina E sobre el transporte hepático de aniones orgánicos colefilicos

El efecto del Al como inductor de colestasis fue asociado a los cambios producidos en el transporte hepático del anión orgánico BSF, ya que, como pudimos observar en los estudios realizados, el metal disminuye tanto la captación sinusoidal (r_{12} , -63%) como la excreción canalicular del colorante (r_3 , -83%), alteraciones que fueron confirmadas con la utilización del anión orgánico no metabolizable RB.

	Al(-)	Al(+)	Al(-) E(+)	Al(+) E(+)
<i>Clp(ml/Kg p.c)</i>	1.53 ± 0.5^a	0.56 ± 0.03^b	1.61 ± 0.07^a	1.66 ± 0.03^a
<i>r12 (min-1)</i>	0.125 ± 0.008^a	0.045 ± 0.007^b	0.110 ± 0.009^a	0.105 ± 0.009^a
<i>r21 (min-1)</i>	0.017 ± 0.001^a	0.014 ± 0.005^a	0.014 ± 0.003^a	0.015 ± 0.003^a
<i>r3 (min-1)</i>	0.028 ± 0.003^a	0.007 ± 0.0001^b	0.027 ± 0.007^a	0.025 ± 0.006^a
<i>t1/2 α(min)</i>	5.7 ± 0.3^a	11.9 ± 1.3^b	6.7 ± 0.5^a	6.0 ± 0.8^a
<i>t1/2 β(min)</i>	21 ± 3^a	59 ± 8^b	26 ± 6^a	21 ± 3^a
<i>Vd (ml)</i>	65 ± 3^a	66 ± 5^a	63 ± 3^a	60 ± 8^a

Tabla 4.10. Efecto de la Vit E sobre los cambios inducidos por el tratamiento con aluminio en las constantes de velocidad fraccional y en los parámetros derivados del análisis bicompartimental del decaimiento plasmático de RB. Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. n = 6 en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffe. Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

Los mecanismos involucrados en las alteraciones de la excreción canalicular del colorante, la cual representa la velocidad limitante de la transferencia global plasma-bilis, estarían asociados al estrés oxidativo producido por el metal. En la tabla 4.10 se puede observar el análisis estadístico de los datos de los parámetros farmacocinéticos de los grupos experimentales utilizados. La co-administración de Vit E previno las alteraciones ocasionadas por el aluminio sobre los parámetros de decaimiento plasmático del colorante RB. La Vit E no afectó *per se* ninguno de los parámetros derivados del análisis compartamental.

4.2.2.3 Efecto preventivo de la Vitamina E sobre los niveles celulares y la actividad del transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico (Mrp2)

Considerando que el transporte canalicular de compuestos colefilicos es el paso limitante en su transferencia global plasma-bilis, y que los resultados hacen hincapié sobre estos eventos del transporte como blanco principal de las alteraciones inducidas por el Al vía estrés oxidativo, sobre la función secretora biliar, determinamos si la Vit E podría ser un instrumento en la prevención de la alteración en la expresión del Mrp2, el principal transportador canalicular implicado en este proceso.

Siguiendo estos conceptos, el Al redujo significativamente los niveles de Mrp2, cuantificados por análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas

del Western blotting, y la co-administración de Vit E previno totalmente estos efectos deletéreos (Fig 4.10).

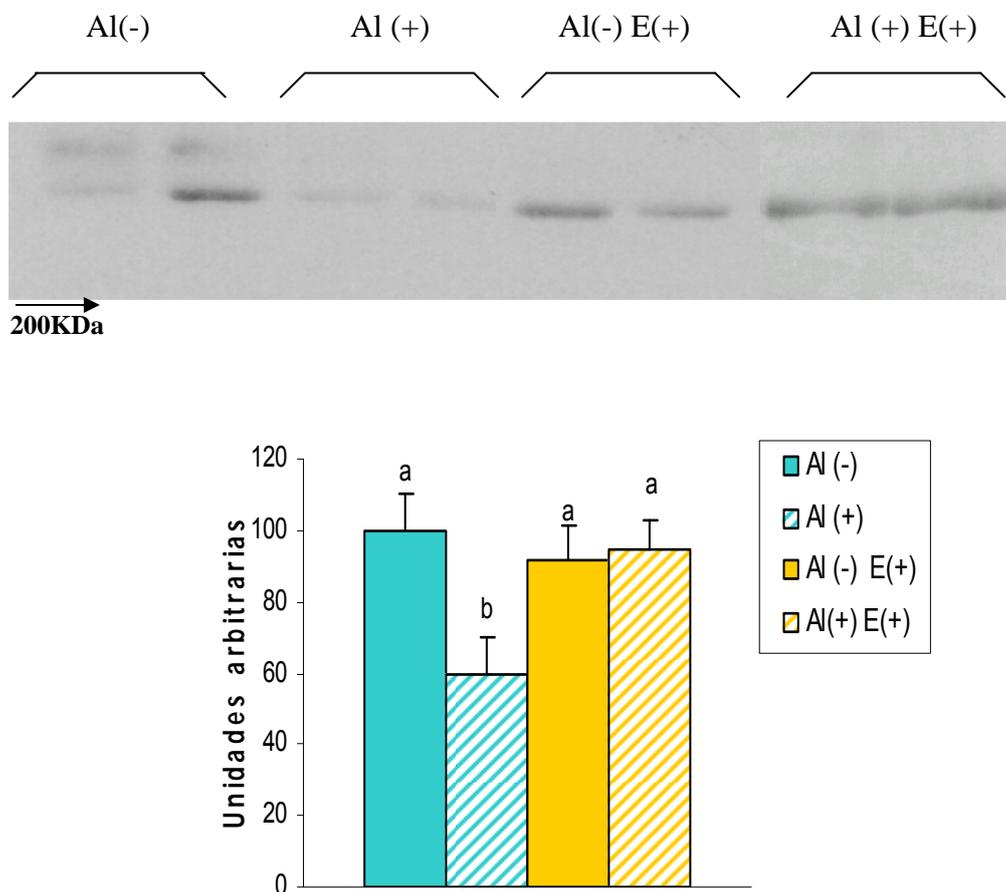


Fig 4.10: En el panel superior: Western blotting del contenido de la proteína Mrp2 en membrana plasmática total de los grupos experimentales (bandas de dos animales representativos por cada grupo). Panel inferior: Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Mrp2. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffe. Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

La normalización de los niveles de Mrp2 por la Vit E en los animales tratados con AI fue asociado a una recuperación de la excreción biliar de su sustrato específico DNP-SG (Fig 4.11).

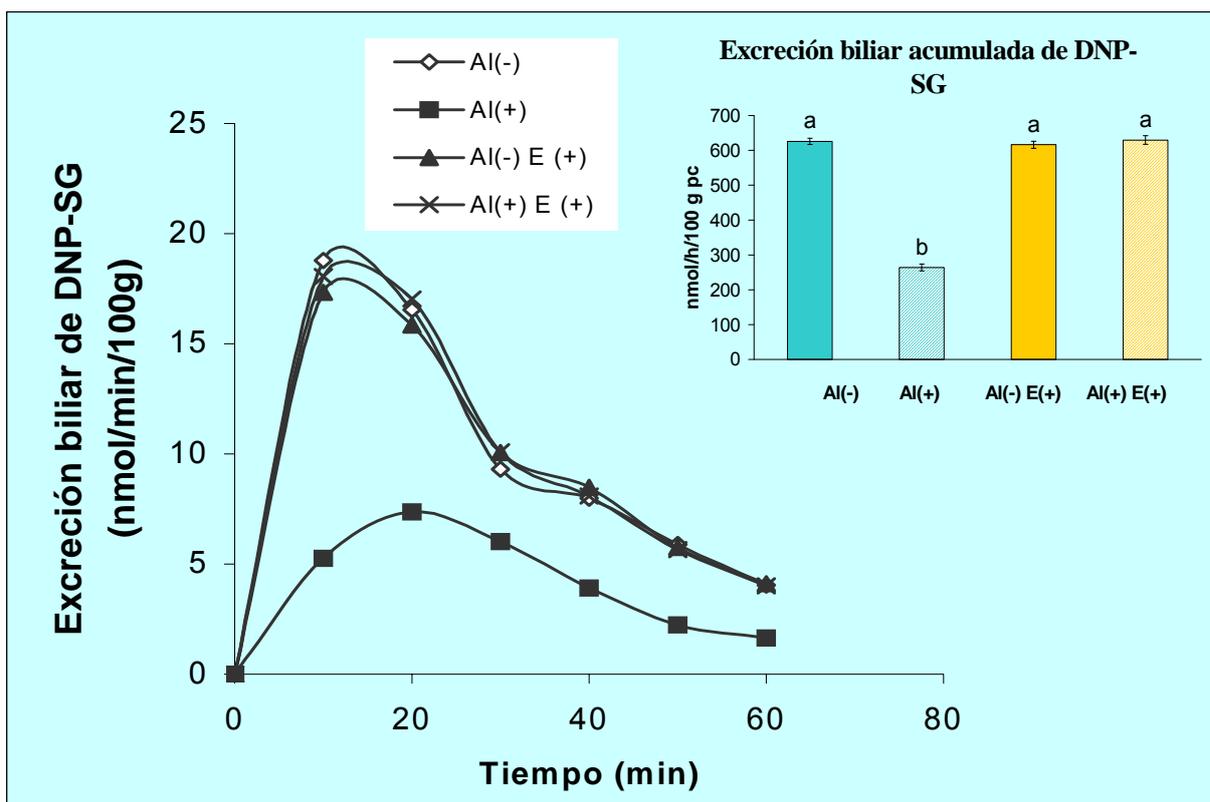


Fig 4.11: Efectos del co-tratamiento con Vit E sobre la velocidad de excreción biliar del DNP-SG. El gráfico del cuadrante superior derecho, muestra la excreción acumulada de DNP-SG a lo largo de todo el período experimental. Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. $n = 6$ en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffé. Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

4.2.3 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

El origen de las alteraciones en la integridad de la membrana hepatocelular puede ser ocasionada por diversos factores, pero el estrés oxidativo inducido por el AI juega un rol crucial. El balance entre fuerzas antioxidantes y oxidantes es interrumpido en ratas tratadas con AI, ya sea por

el aumento en la producción de radicales libres como por la disminución de las defensas antioxidantes (contenido de GSH, CAT, GSH-Px y GST). Nuestros resultados muestran que el Al induce estrés oxidativo coincidiendo con otros autores, cuando el metal es administrado *in vivo* en diferentes formas químicas y crónicamente (53,57,212-214). Así, la hepatotoxicidad *in vivo* depende de la capacidad del metal para inducir estrés oxidativo, y que estos efectos tóxicos pueden ser prevenidos por el tratamiento concomitante con antioxidantes incluyendo Vit E (57,213), Vit C (212) o melatonina (211). De la misma manera, distintos antioxidantes reducen la liberación de enzimas citosólicas en cultivo de hepatocitos, inducida por el tratamiento con Al (215).

La tabla 4.12 muestra los niveles de LPO obtenidos en tejido hepático y el estado de las defensas antioxidantes hepáticas luego del co-tratamiento con Vit E en ratas intoxicadas con Al. La administración de Al indujo un incremento del 50% en la LPO, medida en términos de generación de TBARS. La Vit E, como tratamiento único, no afectó la generación de TBARS basal, pero contrarrestó completamente el incremento de la LPO inducida por el metal. Contrariamente, el contenido total de los compuestos antioxidantes endógenos, GSH, y las actividades de las enzimas antioxidantes, GSH -Px y CAT, fueron significativamente disminuidas por la administración de Al. Cuando se analizaron individualmente estos parámetros en el grupo tratado en forma simultánea con Al y Vit E se obtuvieron valores semejantes al grupo control Al (-) (GSH-Px) o tendientes a la normalización (CAT) mostrando de esta manera el efecto preventivo realizado por la Vit E.

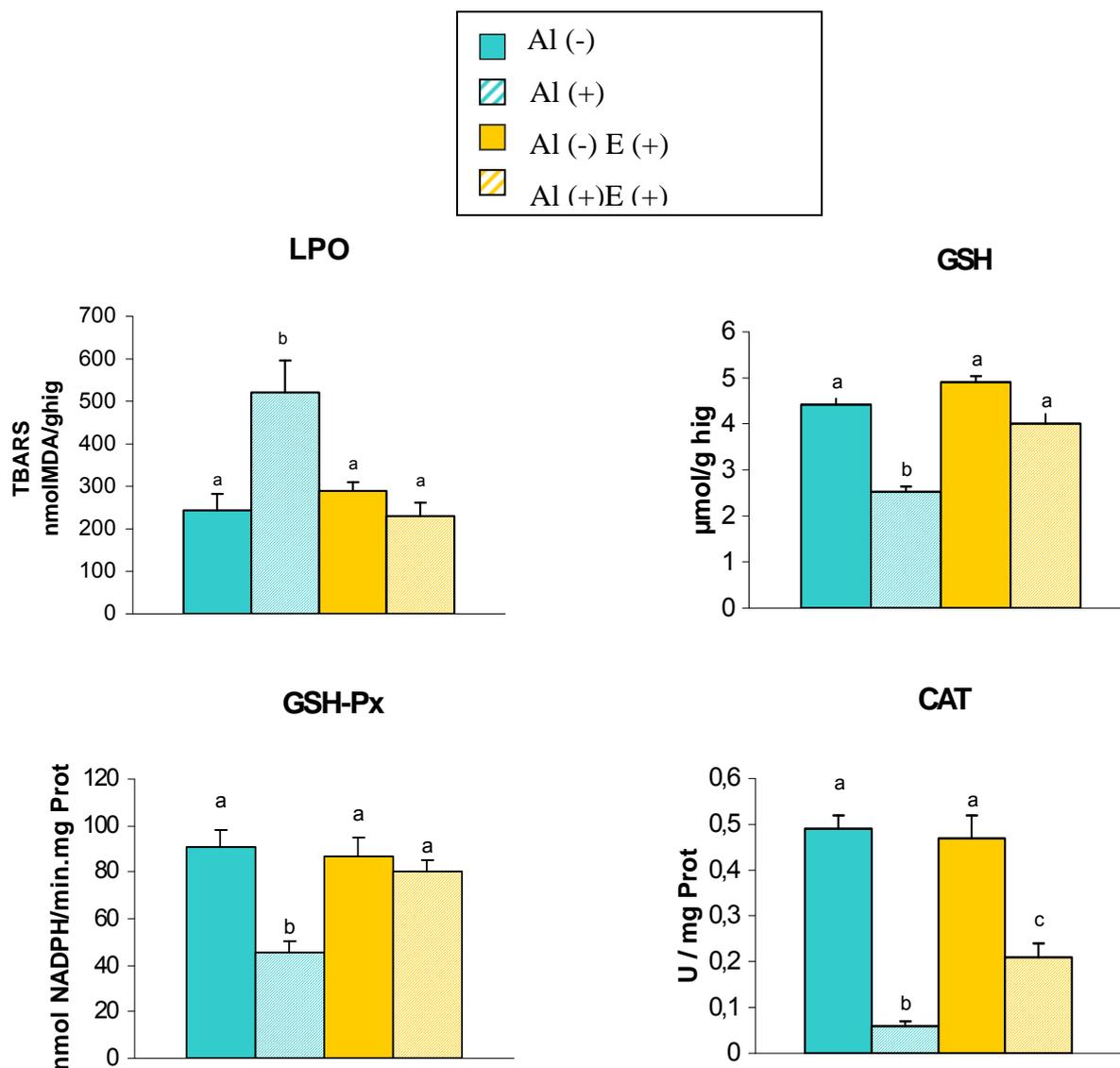


Fig 4.12 Efecto preventivo de la Vit E sobre parámetros de estrés oxidativo. Peroxidación lipídica (LPO); Contenido de sulfhidrilos no proteicos (GSH); Actividad de las enzimas antioxidantes Catalasa (CAT) y Glutacion Peroxidasa (GSH-Px) en homogenados hepáticos medidos en animales de los grupos experimentales. Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. $n = 6$ en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un Análisis de Variancia (2x2 ANOVA) seguido del test no paramétrico de Scheffe. Valores que no comparten el mismo supraíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

4.2.4 EFECTO PREVENTIVO DE LA VITAMINA E EN PARÁMETROS DE ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las imágenes histológicas de hígados de ratas tratadas con Al con o sin co-administración de Vit E se muestran en las Fig 4.13 y 4.14. Los cambios histológicos observados por el tratamiento con Al, necrosis hepatocelular con proliferación de los ductos, fibrosis con aumento del volumen de áreas portales y significativo infiltrado inflamatorio linfocitario portal, fueron prevenidos por el co-tratamiento con Vit E que redujo significativamente el daño histológico producido por el metal.

La Tabla 4.11 muestra el índice apoptótico, el número de conductos biliares en áreas portales, la inflamación del tracto portal, la densidad de volumen de áreas portales, fibrosis y necrosis hepatocelular en cada grupo analizado. El co-tratamiento con Vit E mejora la histología hepática volviéndola similar a la del grupo Al(-).

Esto evidencia que los daños histológicos ocasionados por el Al, están directamente relacionados al estrés oxidativo producido por dicho metal.

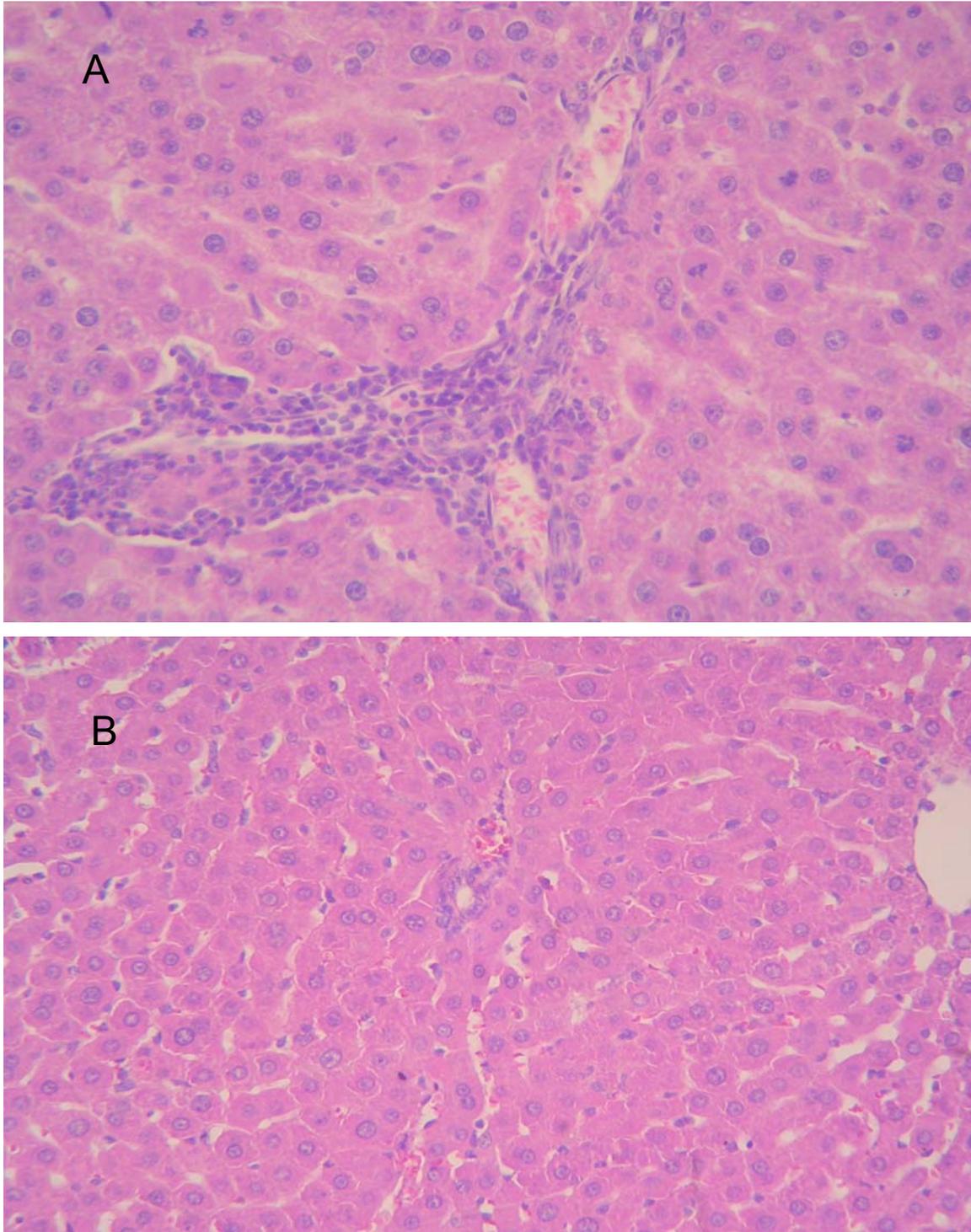


Figure 4.13 Histología representativa de hígados de ratas tratadas con aluminio, sin tratamiento con Vit E (A) o con tratamiento con Vit E (B). Coloración: H&E; original magnification X200.

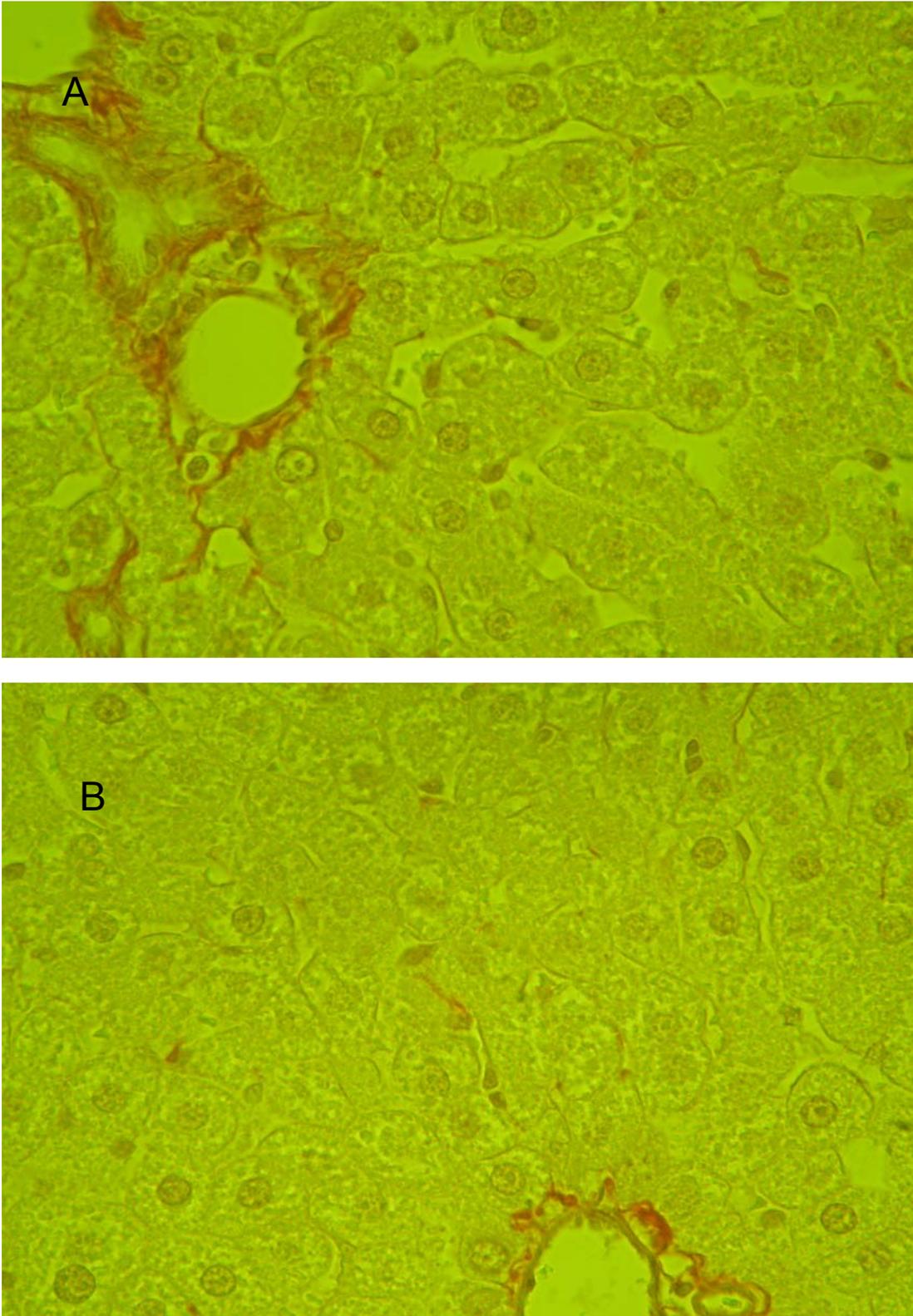


Figure 4.14 Histología representativa de hígados de ratas intoxicadas con aluminio, sin tratamiento con Vit E (A) o con tratamiento con Vit E (B). Coloración: 1% Rojo sirio-ácido pícrico 80 para colágeno.

	AI(-)	AI(+)	AI(-) E(+)	AI(+) E(+)
IA	0.01 ± 0.00^a	0.04 ± 0.007^b	0.01 ± 0.001^a	0.015 ± 0.002^a
NCB	1.20 ± 0.019^a	2.43 ± 0.11^b	1.26 ± 0.019^a	1.31 ± 0.035^a
ITP	1.0 ± 0.001^a	2.4 ± 0.13^b	1.1 ± 0.001^a	1.2 ± 0.13^a
V _{VAP}	1.33 ± 0.03^a	4.93 ± 0.42^b	1.30 ± 0.04^a	1.64 ± 0.35^a
FH	0.62 ± 0.06^a	1.18 ± 0.12^b	0.60 ± 0.04^a	0.55 ± 0.01^a
NH	1.00 ± 0.00^a	2.13 ± 0.09^b	1.00 ± 0.00^a	1.10 ± 0.10^a

Tabla 4.11 Parámetros histológicos en preparados de hígado de ratas de los grupos AI (-) y AI (+). IA: Índice de apoptosis celular expresados como el porcentaje de células y cuerpos apoptóticos contados en 6000 hepatocitos por slices a 400x.. NCB: Número promedio de conductos biliares en áreas portales expresados adimensionalmente desde 1 (mínimo) a 4 (máximo). ITP: Inflamación en tracto portal expresados adimensionalmente desde 1 (mínimo) a 4 (máximo). V_{VAP}: Densidad volumétrica de áreas portales expresadas como porcentaje. FH: Fibrosis hepática evaluada como el porcentaje de área por el tejido hepático. NH: Necrosis hepatocelular expresada adimensionalmente desde 1 (mínimo) a 4 (máximo). Los valores son expresados como la media \pm SEM. n = 4 en cada grupo. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test de Student. * p< 0.05 vs el grupo AI (-).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIÓN

Recientes investigaciones sobre la patogénesis de la toxicidad inducida por el Al han sido focalizadas en el rol que juega el estrés oxidativo en estas alteraciones del metal mediada por sus efectos pro-oxidantes. Así, la neurotoxicidad inducida por el Al está mediada por el estrés oxidativo (215) y similarmente, el daño oxidativo ha sido caracterizado, y relacionado causalmente, con la nefrotoxicidad inducida por el metal (216). En este trabajo se dan evidencias que la hepatotoxicidad y la disfunción secretora biliar inducida por el Al pueden ser atribuidas al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo altera la expresión de los transportadores canaliculares a niveles post transcripcionales, siendo un modificador potencial de la función secretora biliar. Se sabe que activa ciertos factores de transcripción los cuales funcionan como sensores de la condición de estrés oxidativo, tales como NF- χ β (factor de necrosis- K B) y el AP-1 (activador proteico-1) (217,218). Está demostrado que el NF- χ β inducido por citoquinas o lipopolisacáridos, bloquea la transcripción de genes del receptor nuclear androstano constitutivo (CAR), un factor de transcripción que regula la expresión del Mrp2. Tanto NF- χ β como AP-1 efectivamente alteran la expresión de Mrp2 cuando son estimulados por agonistas del CAR, a través de la inhibición del receptor de glucocorticoides, un modulador de la expresión del CAR (218,219,220).

Por otro lado, se ha demostrado que la incorporación de agentes oxidantes en la solución de perfusión, del hígado aislado y perfundido de ratas

conduce a colestasis acompañado por la pérdida de Mrp2 inmunoreactivo de la membrana canalicular, debido en parte, a la internalización del transportador en la vesículas subapicales (220). La internalización como consecuencia del estrés oxidativo largo y sostenido, tal como ocurre en nuestras ratas Al(+), podría conducir a la incorporación de Mrp2 al compartimiento lisosomal seguido de degradación, como se demostró que ocurre tardíamente en la colestasis inducida por lipopolisacaridos (221). Esto puede explicar nuestros resultados que demuestran una disminución en la expresión de Mrp2 en Al(+).

Existe un balance entre la inserción exocítica y la internalización endocítica de transportadores canaliculares, y este balance podría ser interrumpido tanto por la inhibición de la inserción mediada por vesículas de los nuevos transportadores sintetizados, por estimulación de su internalización o por ambos.

Nuestros resultados muestran que las ratas Al(+) presentan una inhibición de la excreción biliar de proteínas y colesterol, dos componentes que pueden llegar a bilis principalmente por un mecanismo vesicular vía microtúbulo dependiente (222). Este hecho evidenciaría una inhibición generalizada del mecanismo vesicular, y eso podría explicar la menor inserción del Mrp2 en la membrana canalicular. No obstante, no puede ser excluida una acción más directa del aluminio en la disminución de la síntesis del Mrp2 y / o en un incremento de la degradación del mismo.

Berlyne y col. (223), hallaron que el Al exagera sus efectos hepatotóxicos por alteración en la síntesis proteica. Esta posibilidad fue confirmada por otros autores que mostraron que los niveles hepáticos de

numerosas proteínas enzimáticas de la fase I de detoxificación hepática disminuyen luego de la exposición al Al (51,54,224). La reducción en los niveles hepáticos de numerosas enzimas reportadas en el presente trabajo, confirman y extienden este concepto a enzimas de fase II de detoxificación (GST) y otras enzimas antioxidantes (CAT y GSH-Px). Además, con respecto a los mecanismos involucrados, las alteraciones inducidas por el Al en la expresión/función de Mrp2, y, presumiblemente, en otras proteínas transportadoras involucradas en el transporte transhepatocelular de compuestos colefílicos podrían explicar, al menos en parte, los efectos colestásicos ocasionados por el metal. Además el Mrp2 media la secreción canalicular de GSH (123) una llave determinante de la llamada fracción independiente de sales biliares en el flujo biliar (205,225).

Los datos aportados en este trabajo confirman que la Vit E efectivamente contrarresta el estrés oxidativo inducido en este modelo animal, donde el Al es administrado crónicamente.

En síntesis, demostramos que la Vit E protege totalmente contra las alteraciones inducidas por el Al en la integridad hepatocelular y en la función secretora hepática lo cual enfatiza el concepto de que la generación de radicales libres es el principal, aunque no el único, mediador de tales alteraciones. Mayores investigaciones de este fenómeno darán cierta luz sobre los mecanismos de la hepatotoxicidad del Al en particular, y en los del estrés oxidativo en la injuria hepatocelular, para lo cual la exposición crónica con Al podría ser el modelo apropiado.

Conclusiones

Considerando los cambios en el estrés oxidativo y en los mecanismos de transporte hepático inducidos por el aluminio y prevenidos por la Vit E, estos hallazgos podrían servir de soporte para la práctica clínica conduciéndonos a la idea de que la Vit E puede ser beneficiosa para la prevención de efectos nocivos del aluminio en personas en riesgo, tales como pacientes en diálisis (226) o con nutrición parenteral (227).

CAPÍTULO 6

RESUMEN

6.- RESUMEN

El Al no constituye un elemento esencial para los organismos vivos, ya que no se han descrito mecanismos biológicos que lo involucren con procesos metabólicos que controlen su biodisponibilidad.

Por su ubicuidad en el ambiente, la exposición de la población al Al es prácticamente sostenida a lo largo de la vida, y puede dar como resultado una sustancial acumulación corporal del mismo. La exposición tiene su origen en el uso del Al en medicina, en la industria farmacéutica, en la elaboración de vacunas, en la preparación de formulaciones nutricionales y alimentos, en la manufactura de cosméticos y antitranspirantes, en la fabricación de latas y envoltorios, y a su presencia en el agua de bebida y en el polvo atmosférico.

Los efectos tóxicos del Al sobre los tejidos pueden explicarse por mecanismos generales de acción, entre los que se destacan: a) disrupción de las membranas celulares, b) alteración del metabolismo mineral, c) daño por estrés oxidativo, d) interacción con proteínas. Por ejemplo, el Al podría afectar las membranas celulares por su unión a componentes de la misma, por alteración del funcionamiento de las compuertas de canales iónicos o por aumento de la lipoperoxidación. La unión del Al^{+3} a moléculas de fosfolípidos en la membrana celular puede alterar las propiedades fisicoquímicas de las mismas modificando su composición y funcionamiento. Esto puede producir cambios en la homeostasis del calcio intracelular provocando diversos signos de toxicidad celular.

Aunque ha sido demostrado sus efectos en otros órganos, poco se sabe de su acción en el hígado. Así, nuestro objetivo fue investigar las alteraciones hepáticas ocasionadas por una exposición crónica del aluminio en animales de experimentación. Para tal fin, ratas machos de la cepa Wistar, fueron tratadas con Al (80 mg Al (OH)₃ /Kg pc. ip) durante 90 días. En animales controles (sin tratamiento) o tratados con Al, se evaluaron: flujo biliar total e independiente de sales biliares, velocidad de excreción de compuestos biliares, transporte de aniones orgánicos, actividad enzimática Glutathion S-transferasa citosólica (GST), sistema implicado en la conjugación intrahepática de sustancias endógenas y exógenas, parámetros indicadores de estrés oxidativo, defensas celulares antioxidantes, niveles celulares y actividad de transportadores canaliculares. Paralelamente se realizaron estudios histológicos.

La administración crónica de aluminio disminuyó tanto el flujo biliar como la velocidad de excreción de componentes de la bilis.

El efecto del Al sobre los sistemas de transporte canalicular fue estudiado *in vivo*, a través del manejo hepático del anión orgánico Bromosulfoftaleína (BSF), compuesto colorante relativamente no tóxico, que es comúnmente utilizado como indicador de la función hepática. Con este propósito, fue realizado el análisis farmacocinético de la desaparición plasmática del colorante, el cual proporciona una estimación cuantitativa de la eficiencia de los eventos por los cuales los transportadores están funcionando en el hepatocito *in vivo*. El tratamiento con Al redujo significativamente la depuración plasmática de la BSF (-59%), la cual fue acompañada por una significativa reducción en la velocidad fraccional de captación (r_{12} -53%) y de

excreción (r_3 -43%) del colorante como así también del decaimiento plasmático de la BSF. Estas alteraciones estuvieron relacionadas con un incremento de los valores del tiempo de vida medio para las fases rápida y lenta del decaimiento plasmático.

Por otro lado, el tratamiento de 90 días con AI disminuyó significativamente la actividad de la GST. La disminución en los niveles de esta enzima observados podrían explicar la reducción en la velocidad de transferencia canalicular r_3 en los animales tratados con AI.

Debido a los resultados obtenidos y para descartar definitivamente la implicancia de la conjugación en la transferencia canalicular, se procedió a utilizar otro colorante, el Rosa de Bengala, que no es conjugado durante su tránsito a través del hepatocito. El análisis farmacocinético siguiendo el modelo utilizado para el colorante BSF, indicó que tanto la depuración plasmática como las velocidades de transferencia fraccional para el transporte del colorante desde el plasma al hígado (r_{12}) y desde el hígado a la bilis (r_3), fueron alterados por la administración de AI.

Esto condujo, entonces, a estudiar tanto los niveles celulares como la actividad transportadora del Mrp2, transportador canalicular más importante involucrado en el proceso de excreción biliar. El AI, en la forma y tiempo utilizado, produce una disminución de los niveles de Mrp2 de un 40% y de un 50% en la actividad transportadora de esta proteína evaluada *in vivo* por el análisis de la excreción biliar del sustrato específico de Mrp2, dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG). La excreción biliar del DNP-SG refleja tanto la actividad de conjugación de la GST como la eficiencia transportadora del Mrp2.

Dado que la actividad de conjugación de la enzima GST disminuyó significativamente menos que la actividad transportadora de Mrp2, la capacidad de conjugación biliar no sería el único mecanismo implicado en la disminución de la excreción biliar inducido por el AI. Por lo tanto, la alteración en la transferencia canalicular de los colorantes estudiados ocurriría mayormente debido a la alteración en la actividad o en el contenido de su transportador canalicular, Mrp2. El análisis por Western Blot y la alteración en la actividad funcional del Mrp2, confirman esta hipótesis.

Parámetros indicadores de estrés oxidativo o de sus mecanismos de defensa fueron evaluados en homogenados hepáticos. El tratamiento con AI mostró evidencias de daño oxidativo en hígado. En este sentido el contenido de TBARS obtenido como medida de la lipoperoxidación *in vivo*, se encontró significativamente aumentado asociado a una disminución significativa en el contenido de glutation (GSH) hepático y a una disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y GSH-Px. Esto sugiere que la acción del AI a nivel hepático podría estar mediada por un desbalance en el estado redox de la célula, que se refleja en un incremento en la lipoperoxidación y en una disminución en los mecanismos de defensas antioxidantes.

Las imágenes histológicas de ratas tratadas con AI muestran una significativa necrosis hepatocelular con proliferación de los ductos y fibrosis. Se observa además, un aumento del volumen de áreas portales con significativo infiltrado inflamatorio principalmente linfocitario. Las características histológicas de la hepatotoxicidad inducida por el AI reveladas por los estudios

realizados, indican que el metal induce tanto apoptosis como necrosis hepatocelular.

Estos hallazgos inducen a relacionar el estrés oxidativo con los efectos deletéreos sobre la función biliar ocasionados por el Al. Es conocido que el estrés oxidativo altera la expresión de los transportadores canaliculares a niveles post transcripcionales, siendo un modificador potencial de la función secretora biliar. Además, naturalmente existe un balance entre la inserción exocítica y la internalización endocítica de transportadores canaliculares, y este balance podría ser interrumpido tanto por la inhibición de la inserción mediada por vesículas de los nuevos transportadores sintetizados, por estimulación de su internalización o por ambos. Además, nuestros resultados demostraron que las ratas tratadas con Al presentan una inhibición de la excreción biliar de proteínas y colesterol, dos componentes que pueden llegar a bilis principalmente por un mecanismo vesicular vía microtúbulo dependiente. Este hecho evidenciaría una inhibición generalizada del mecanismo vesicular, y eso podría explicar la menor inserción del Mrp2 en la membrana canalicular.

Bajo la hipótesis del rol potencial del estrés oxidativo sobre la función secretora biliar, en la segunda parte de nuestro trabajo se utilizó un co-tratamiento con Vit E. Dado que es conocida la función antioxidante de la Vit E en la prevención del estrés oxidativo, se investigó su rol sobre los efectos deletéreos ocasionados por el Al sobre la función secretora biliar.

Para este propósito animales tratados o no con Al recibieron un co-tratamiento con Vit E. En los mismos se analizaron los parámetros anteriormente estudiados.

Los resultados muestran que la Vit E previno el daño lipoperoxidativo, como también normalizó los niveles de los distintos parámetros relacionados a las defensas antioxidantes. Estos hallazgos fueron asociados con la normalización de la función secretora biliar y los daños histológicos inducidos por el AI. Los mecanismos de acción de la Vit E podrían estar vinculados a la prevención en la formación de radicales libres, a la acción protectora sobre las membranas celulares y/o a la modificación de la biodisponibilidad del AI.

Esto muestra el rol crucial que el estrés oxidativo podría tener en el daño hepatocelular ocasionado por el AI.

En su conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis constituyen un avance en el conocimiento e interpretación de los mecanismos involucrados en el daño hepático inducido por el AI. Desde el punto de vista de la práctica médica, la incorporación de Vit E puede ser beneficiosa para prevenir los efectos nocivos del AI en personas en riesgo, tales como pacientes en diálisis o con nutrición parenteral.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Cox, P.A., The elements of earth. (1995). Inorganic Chemistry in the Environment. Oxford University Press, Oxford.
- 2) Exley, C., Birchall, J.D. (1992). The cellular toxicity of aluminium. J.Theor. Biol. 159,83-98.
- 3) Exley,C.,Pinnegar,J.K.,Taylor,H.J.(1997). Hydroxyaluminosilicates and acute aluminum toxicity in fish. Theor. Biol. 189,133-139.
- 4) Flaten, T.P., Alfrey, A.C., Birchall, J.D., Savory, J., Yokel, R.A. (1997). Status and future concerns of clinical and environmental aluminum toxicology. Chapter1, pp1-15. Research Issues in Aluminum Toxicity. Edited by R.A. Yokel and M.S. Golub. Taylor &Francis, Bristol, USA.
- 5) Rondeau, V., Commenges, D. (2001). The ipidemiology of aluminium and Alzheimer 's Disease. Pp. 59. Aluminium and Alzheimer's Disease. The sciencie that describes the link. Edited by C. Exley. Elsevier Science Amsterdam. Holanda.
- 6) Pennington, J.A., Schoen, S.A. (1995). Estimates of dietary exposure to aluminium Food Add Contam 12,119-128.
- 7) Greger, J.L., Sutherland, J.E. (1997). Aluminum exposure and metabolism. Crit Rev Clin Lab Sci 34,439-474.
- 8) Exley, C. (1998). Does antiperspirant use increase the risk of aluminium related disease, including Alzheimer 's Disease. Mol Med Today 4,107-109.

- 9) Yokel, R.A., McNamara, P.J. (2001). Aluminium toxicokinetics: An updated minireview. *Pharmacology & Toxicology*. 88,159-167.
- 10) Taylor, G.A., Moore, P.B., Ferrier, S.P., Tyrer, J.A., Edwardson, J.A. (1998). Gastrointestinal absorption of aluminium and citrate in man. *J Inorg Biochem* 69,165-169.
- 11) Exley, C., Burgess, E., Day, P., Jeffery, E.H., Melethil, S., Yokel, R.A. (1997). Aluminium Toxicokinetics. Chapter 6, pp 117-132. *Research Issues in Aluminum Toxicity*. Edited by R.A. Yokel and M.S. Golub. Taylor & Francis, Bristol, USA.
- 12) Martin, R.B. The importance of aluminium chemistry in biological systems. (1997). Chapter 1, pp 3-15. *Aluminium Toxicity in Infants Health and Disease*. Edited by Zatta, P.F. & Alfrey, A.C. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore.
- 13) Bellia, J.P., Newton, K., Davenport, A., Birchall, J.D., Roberts, N.B. (1994). Silicon and aluminium and their inter-relationship in serum and urine after renal transplantation. *Eur J Clin Invest* 24,703-710.
- 14) Harrington, C.R., Wischick, C.M., McArthur, F.K., Taylor, G.A., Edwardson, J.A., Candy, J.M. (1994). Alzheimer 's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet*. 343,993-997.

Bibliografía

- 15) Savory, J., Exley, C., Forbes, W.F., Huang, Y., Joshi, J.G., Kruck, T., McLachlan, D.R.C., Wakayama, I. (1996). Aluminum and Alzheimer's- disease. *J Toxicol Environ Health*. 48,615-635.
- 16) Anghileri, L.J., Maincent, P., Thouvenot, P. (1994). Long term oral administration of aluminum in mice. Aluminum distribution in tissues and effects on calcium metabolism. *Ann Clin Lab Sci* 24,22-26.
- 17) Gómez, M., Sánchez, D., Llobet, J.M., Corbella, J., Domingo, J.L. (1997). The effect of age on aluminum retention in rats. *Toxicology* 116,1-8.
- 18) Spencer, A.J., Wood, J.A., Sounders, H.C., Freeman, M.S., Lote, C.J. (1995). Aluminium deposition in liver and kidney following acute intravenous administration of aluminium chloride or citrate in conscious rats. *Human Exp Toxicol* 14 (10), 787-794.
- 19) Duglaszek, M., Fiejka, M.A., Graczyk, A., Aleksandrowicz, J.C., Slowikowska, M (2000). Effects of various aluminium compounds given orally to mice on Al tissue distribution and tissue concentrations of essential elements. *Pharmacol Toxicol* 86,135-139.
- 20) Harris, W., Berthon, G., Day, J.P, Exley, C., Flaten, T., Forbes, W., Kiss, T., Orving, C., Zatta, P. (1997). Speciation of aluminium in biological systems. Chapter 5, pp 91-116. *Research Issues in Aluminum Toxicity*. _Edited by R.A. Yokel and M.S. Golub. Taylor & Francis, Bristol, USA.

- 21) Zatta, P. Aluminium toxicity depends on the metal speciation. (1997). Chapter 3, pp 40-53. Aluminium _Toxicity in Infants Health and Disease. Edited by Zatta, P.F. & Alfrey, A.C. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore.
- 22) Ohman, L.O., Sjoberg, S. Thermodynamic calculations with special reference to the aqueous system. (1988). Chapter 1, pp 1-40. Metal Speciation: Theory, Analysis and Application. Edited by Kramer J.R. & Allen H. E., Lewis Publishers. Chelsea.
- 23) Martin, R.B., Savory, J., Brown, S. Bertholf, R.L., Wills, M.R. (1987). Transferrin binding of Al³⁺ and Fe³⁺. Clin. Chem. 33, 405-407.
- 24) Harris, W., Sheldon, J. (1990). Equilibrium constants for the binding of aluminium to human serum transferrin. Inorg. Chem. 29,119-124.
- 25) Ganrot, P.O. (1986). Metabolism and possible health effects of aluminum. Environ. Health Perspect. 65, 363-441.
- 26) Fatemi, S.J.A., Williamson, D.J., Moore, G.R. (1992). A ²⁷Al NMR investigation of Al³⁺ binding to small carboxylic acids and the proteins albumin and transferrin. J. Inorg. Biochem. 46,35-40.
- 27) Jeffery, E.H., Abreo, K., Burgess, E., Cannata, J., Greger, J.L. (1997). Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hepatopoietic tissue and kidney. Chapter 7,pp134-146. Research Issues in aluminum Toxicity. Edited by R.A.Yokel and M.S.Golub. Taylor&Francis, Bristol, USA.

Bibliografía

- 28) Abreo, K., Glass, J., Jain, S., Sella, M. (1994). Aluminum alters the compartmentalisation of iron in friend erythroleukemia cells. *Kidney int.* 45,636-664.
- 29) Perez, G., Vittori, K., Garbossa, G., Nesse, A. (2002). Toxicidad del aluminio sobre el sistema eritropoyético. Mecanismos involucrados. *Acta Bioquím Clin Latinoam XXXVI*, 1,41-50.
- 30) Rollin, H.B., Theodorou, P., Kilroe-Smith, T.A. (1993). Changes in the concentration of cooper and zinc of rabbits following the inhalation of low concentrations of Al_2O_3 dust. *S African J. Sci* 89,246-249.
- 31) Golub, M.S., Han, B., Keen, C.L., Gershwin, M.E. (1993). Developmental patterns of aluminium in mouse brain and effects of dietary aluminum excess on manganese deficiency. *Toxicology* 81,33-47.
- 32) Miller, J.L., Hubbard, C.M., Litman, B.J., Mac Donald, T.L. (1989). Inhibition of transducin activation and guanosine triphosphatase activity by aluminum ion. *J Biol Chem* 264,243-250.
- 33) Dominguez, M.C., Sole, E., Goni, C., Ballbriga, A. (1995). Effect of aluminium and lead salts on lipid peroxidation and cell survival in human skin fibroblasts. *Biol Trace Elem Res* 47,57-67.
- 34) Xie, C.X., Yokel, R.A. (1996). Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminum and iron concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 327,222-226.

- 35) Exley, C (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic Biol Med* 36,380-387.
- 36) Oteiza, P.I. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 308,374-379.
- 37) Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Golub, M.S., Oteiza, P. (1998). Membrane composition can influence the rate of Al⁺³-mediated lipid oxidation: effect of galactolipids. *Biochem J.* 333,833-838.
- 38) Nesse, A., Garbossa, G. (2001). Aluminium toxicity in Erythropoiesis. Mechanisms related to cellular dysfunction in Alzheimer's Disease. 261-277. *Aluminium and Alzheimer's Disease. The science that describes the link.* Edited by C. Exley. Elsevier Science Amsterdam. Holanda.
- 39) Wills, M.R., Savory, J. (1983). Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *Lancet.* ii,29-34.
- 40) Yasui, M., Yase, Y., Ota, K., Mukoyama, M., Adachi, K. (1991). High aluminium deposition in the central nervous system of patients with amyotrophic lateral sclerosis from the Kii Peninsula Japan: two case reports. *Neurotoxicology* 12,277-283.
- 41) Kausz, A.T., Antonsen, J.E., Hercz, G., Pei, Y., Weiss, N.S., Emerson, S., Sherrard, D.J. (1999). Screening plasma aluminum levels in relation to aluminum bone disease among asymptomatic dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 34,688-693.

- 42) Nesse, A., Garbossa, G., Stripeikis, J., Galvez, G., Castro, M.E., Rizzo, N., Lauricella, A., Gutnisky, A. (1997). Aluminum accumulation in chronic renal failure affects erythropoiesis. *Nephrology*. 3,347-351.
- 43) Vittori, D., Nesse, A., Perez, g., Garbossa, G. (1999). Morphological and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium. *J Inorg Biochem* 76,113-120.
- 44) Mahieu, S., Contini, M., González, M., Millen, N., Elías, M.M. (2000). Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicol Lett* 111,235-242.
- 45) Exley, C. (1999). A molecular mechanism of aluminum induced Alzheimer 's disease. *J Inorg Biochem* 76,133-140.
- 46) Cannata Andía, J.B. (2000). Adynamic bone and chronic renal failure:an overview. *Amer J Med Sci* 320,81-84.
- 47) Seedman, A. (1992). Aluminum toxicity in chidhood. *Pediatr Nephrol* 6,383-393.
- 48) Cannata, J.B. (1988). Aluminium –induced toxicity in dislysed patients. Role of water and other sources on its pathogenesis. *Water treatment monograph*. EDTNA-ERCA, Pitman. 3, 50-64.
- 49) Klein, G.L., Heyman, M.B., Lee, T.C. (1988). Aluminum-associated hepatobiliary dysfunction in rats: relationships to dosage and duration of exposure. *Pediatr Res*; 23, 275-8

- 50) Klein, G.L., Lee, T.C., Herman, M.B., Rassin, D.K. (1989). Altered glycine and taurine conjugation of bile acids following aluminum administration to rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 9, 105-7
- 51) Jeffery, E.H., Cansen, H.T, Dellinger, J.A.. (1987). In vivo interactions of aluminum with hepatic cytochromo P-450 and metallothionein. *Fundam. Appl. Toxicol.* 8, 541-8.
- 52) Takikama, H. (2002). Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9, 443-447
- 53) Moumen, R., Ait-Oukhatar, N., Bureau, F., Fleury, C., Bougle, D., Arhan, P., Neuville, D., Viader, F. (2001). Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol*, Jan 2001; 15(2-3), 89-93.
- 54) Fulton, B., Jeffery, E.H. (1994). The temporal relationship between hepatic GSH loss, heme oxigenase induction and cytochrome P450 loss following intraperitoneal aluminium administration to mice. *Toxicology and applied Pharmacology.* 127, 291-297.
- 55) Mari, M., Cederbaum, A.I. (2001). Induction of catalase, α , and microsomal glutathione s-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology* 33,652-661.
- 56) El-Maraghy, S. A., Gad, M. Z., Fahim, A. T., and Hamdy, M. A. (2001). Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 207-214.

Bibliografía

- 57) Abubakar, M. G., Taylor, A., and Ferns, G. A. (2003). Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. *Int. J. Exp. Pathol.* 84, 49-54.
- 58) Cingolani, H.E., Houssay, A.B. y col. (2002) Fisiología Humana. 7º Edición. 208-225.
- 59) Nahrwold, D.L. (1971) Secretion by the common duct in response to secretin. *Surg Rorum* 22, 386.
- 60) Rudman, D., Kendall, F.E. (1957). Bile acid contents of human serum. II The binding of cholanic acids by human plasma protein. *J Clin Invest* 36,532.
- 61) Iga, T., Klaasen, C.D. (1982). Hepatic extraction of bile acids in rats. *Biochem Pharmacol.* 31, 205.
- 62) Hardison, W.G.W, Wood, C.A. (1978). Importance of bicarbonate in bile salt independent fraction of bile flow.*Am.J.Physiol* 235 (Endocrinol Metab Gastrointest Physiol 4), E158.
- 63) Hargraves, T. (1968). The liver and Bile Metabolism. Appleton-Century-Crofts. New York.
- 64) Sperber, I. (1959). Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharmacol Rev* 11,109-134.
- 65) Brauer, R.W., Leong, G.F., Holloway, R.J. (1954). Mechanisms of bile secretion: Effect of perfusion pressure and temperature on bile flow and bile secretion pressure. *Am J Physiol* 177,103-112.

- 66) Wisner, M.H., Evans, W.H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. *Biochem J* 146, 375.
- 67) Brodersen, R. (1979) Bilirubin solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J Biol Chem* 254, 2364.
- 68) Nerli, B., Leiva, L., Picó, G. (1987) Studies on thermodynamics and nature of interaction between human serum albumin and some bile salts. *Studia biophys* 118, 135.
- 69) Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., Hess, F.A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cells. I. Morphometric model, stereologic methods, and a normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 42, 68.
- 70) Roma, M., Peñalva, G.L., Agüero, R.M and Rodríguez Garay, E.A. (1994). Hepatic transport of organic anions in taurolithocholate-induced cholestasis in rats. *Journal of Hepatology*. 20: 603-610.
- 71) Cotting, J., Reichen, J. (1989). Bile salts and hydrodynamic of bile formation. *J Hepatol* 8, 13.
- 72) Boyer, J.L., Layden, T.J., Hruban, Z. (1977). Mechanism of cholestasis: taurolithocholate alters canalicular membrane composition, structure and permeability. In: *Membrane alterations as basis of liver injury*. Popper H, Bienachi L, Reutter W (eds). MTP Press limited, Lancaster, England, pp 353.
- 73) Ballatori, N., Truong, T. (1989). Relation Between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 256 (Gastrointest Liver Physiol 19), G22.

- 74) Graf, J. (1983) Canalicular bile salt-independent bile formation: concepts and clues from electrolyte transport in rat liver. *Am J Physiol* 244 (Gastrointest Liver Physiol 7), G233.
- 75) Benedetti, A., Strazzabosco, M., Corasanti, J.G., Haddad, P., Graf, J., Boyer, J.L.(1991). Cl(-)-HCO₃⁻ exchanger in isolated rat hepatocytes: role in regulation of intracellular pH. *Am J Physiol* 261,G512-G522.
- 76) Martinez-Anso, E., Castillo, J.E., Diez, J., Medina, J.F., Prieto, J. (1994).Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonato anion exchangers in human liver. *Hepatology* 19, 1400-1406.
- 77) Krenhumber, H.G., Ferberbauen, F.X., Graf, J.(1997). Is intracellular pH and/or intracellular bicarbonate a determinant of bile salt independent canalicular bile formation? The subject revisited. *Yale J Biol Med* 70,459-469.
- 78) Graf, J., Henderson, R.M., Krumholz, B., Boyer, J.L. (1987). *J Membr Biol* 95,241-254.
- 79) Myers, N.C., Grune, S., Jameson, H.L, Sawkat-Anwer, M. (1996) cGMP stimulates bile acid-independent bile formation and biliary bicarbonate excretion. *AmJ Physiol* 270,G418-G424.
- 80) Ballatori, N., Truong, A.T. (1992). Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 263,G617-G624.
- 81) Ballatori, N., Dutczak, W.J. (1994). Identification and characterization of high and low affinity transport systems for

- reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem* 269,19731-19737
- 82) García-Ruiz,C., Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N.(1992). Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rathepatocytes and membrane vesicles. *J Biol Chem* 267,22256-22264.
- 83) Li, L., Lee, T.K., Meier, P.J., Ballatori, N. (1998). Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidad organic solute transporter. *J Biol Chem* 273,16184-16191.
- 84) Ookhtens, M., Lyon, I., Fernandez-Checa, J., Kaplowitz, N. (1988). Inhibition of glutathione efflux in the perfused rat liver and isolated hepatocytes by organic anions and bilirubin. Kinetics, sidedness, and molecular forms. *J Clin Invest* 82,608-616.
- 85) Mittur, A., Wolkoff, A.W., Kaplowitz, N. (2002). The thiol sensitivity of glutathione transport in sidedness-sorted basolateral liver plasma membrane and in Oatp1-expressing HeLa cell membrane. *Mol Pharmacol* 61,425-435.
- 86) Yang, B., Hill, C.E. (2001). Nifedipine modulation of biliary GSH and GSSG/conjugate efflux in normal and regenerating rat liver. *Am J Physiol* 281,G85-G94.
- 87) Inoue, M., Kinne, R., Tran, T., Arias, I.M. (1983). The mechanism of biliary secretion of reduced glutathione. Analysis of transport

- process in isolated rat-liver canalicular membrane vesicles. *Eur J Biochem* 134,467-471.
- 88) Fernandez-Checa, J.C., Takikawa, H., Horie, T., Ookhtens, M., Kaplowitz, N. (1992). Canalicular transport of reduced glutathione in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats. *J Biol Chem* 267,1667-1673.
- 89) Albers, C.J.E.M., Hulzenga, J.R., Krom, R.A.F., Vonk, R.J. (1985). Composition of human hepatic bile. *Ann clin Biochem* 22:129.
- 90) Anwer, M.S., Hegner, D. (1983). Role of inorganic electrolytes in bile acid independent canalicular bile formation. *Am J Physiol* 244 (Gastrointestest liver Physiol 7),G116.
- 91) Klaassen, C.D. (1975). Biliary excretion of xenobiotics. *Crit Rev Toxicol* 4,1-30.
- 92) Hart, L.G., Schanker, L.S. (1966). Active transport of chlorothiazide into bile. *Am J Physiol* 211,643-646.
- 93) Reichen, J. (1999). The role of the sinusoidal endothelium in liver function. *News Physiol Sci* 14,117-121.
- 94) Inoue, M., Kinne, R., Tran, T., Arias, I.M. (1982). Taurocholate transport by rat liver sinusoidal membrane vesicles: evidence of sodium cotransport. *Hepatology* 2,572-579.
- 95) Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lubbert, H., Meier, P.J. (1991). Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88,10629-10633.

- 96) Bohan, A., Boyer, J.L. (2002). Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions. *Semin Liver Dis* 22,123-136.
- 97) Torres, A.M., Lunazzi, G.C., Stremmel, W., Tiribelli, C. (1993). Bilirubin translocase and sulfobromophthalein/bilirubin-binding protein are both involved in the hepatic uptake of organic anions. *Proc Natl Acad Sci USA* 90,8136-8139.
- 98) Wolkoff, a.W. (1996) Hepatocellular sinusoidal membrane organic anion transport and transporters. *Semin Liver Dis* 16,121-127.
- 99) Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J. (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20,273-292.
- 100) Meier, P.J., Stieger B. (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64,635-661.
- 101) Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258,1650-1654.
- 102) Van Montfort, J.E., Muller, M., Groothuis, G.M., Meijer, D.K., Koepsell, H., Meier, P.J. (2001). Comparison of type I and type II organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther* 298,110-115.
- 103) Elkjaer, M., Vajda, Z., Nejsum, L.N., Kwon, T., Jensen, U.B., Amiry-Moghaddam, M., Frokiaer, J., Nielsen, S. (2000).

- Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem biophys Res Commun* 276,1118-1128.
- 104) Huebert, R.C., Splinter, P.L., García, F., Marinelli, R.A., LaRusso, N.F. (2002). Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *J Biol Chem* 277,22710-22717.
- 105) Stolz, A., Takikama, H., Sugiyama, Y., Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N. (1987). 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity of the Y bile acid binders in rat liver cytosol. Identification, Kinetics, and physiologic significance,. *J Clin Invest* 79,427-434.
- 106) Stolz, A., Hammond, L., Lou, H., Takikawa, H., Ronk, M., Shively, J.E. (1993). cDNA cloning and expression of the human hepatic bile acid-binding protein. A member of the monomeric reductase gene family. *J Biol Chem* 268,10448-10457.
- 107) Takikama, H., Stolz, A., Sugimoto, M., Sugiyama, Y., Kaplowitz, N. (1986). Comparison of the affinities of newly identified human bile acid binder and cationic glutathione S-transferase for bile acids. *J Lipid Res* 27,652-657.
- 108) Takikama, H., Stolz, A., Sugiyama, Y., Yoshida, H., Yamanaka, M., Kaplowitz, N. (1990). Relationship between the newly identified bile acid binder and bile acid oxidoreductases in human liver. *J Biol Chem* 265,2132-2136.

- 109) Thumser, a.E., Wilton, D.C. (1996). The binding of cholesterol and bile salts to recombinant rat liver fatty acid-binding protein. *Biochem J* 320,729-799.
- 110) Dietrich, a., Dieminger, W., Fuchte, K., Stoll, G.H., Schlitz, E., Gerok, W., Kurz, G. (1995). Functional significance of interaction of H-FABP with sulfated and nonsulfated taurine-conjugated bile salts in rats liver. *J Lipid Res* 36,1745-1755.
- 111) Arias, I.M., Fleischner, G., Listowsky, I., Kamisaka, K., Mishkin, S., Gatmaitan, Z. (1976). On the structure and function of ligandin and Z protein. In: *The hepatobiliary System*, ed. W. Taylor, New York, Plenum, pp 88-104.
- 112) Habing, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Garmaitan, Z., Arias, I.M., Jakoby, W.B. (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc. Natl Acad Sci USA* 71,3879-3882.
- 113) Kamisaka, K., Litowsky, I., Gatmaitan, Z., Arias, I.M. (1975). Interactions of bilirubin and other ligands with ligandin. *Biochemistry*. 14,2175-2180.
- 114) Kamisaka, K., Gatmaitan, Z., Moore, C.L., Arias, I.M. (1975). Ligandin reverses bilirubin inhibition of liver mitochondrial respiration in vitro. *Pediatr Res* 9, 903-905.
- 115) Boyer, J.L., Schwarz, J., Smith, N. (1976). Selective hepatic uptake and biliary excretion of ³⁵S-sulfobromophthalein in marine alasmobranchs. *Gastroenterology* 78,254-256.

- 116) Keppler, D., Arias, I.M. (1997). Hepatic canalicular membrane. Introduction: transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J* 11,15-18.
- 117) Silverman, J.A., Schrenk, D. (1997). Expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J* 11,308-313.
- 118) Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., Meier, P.J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273,10046-10050.
- 119) Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Paqloqska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., Thompson, R.J. (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 20,233-238.
- 120) Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461,377-394.
- 121) Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., Sugiyama, Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile SALT export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511,7-16.

- 122) Mills, C.O., Milkiewicz, P., Muller, R., Roma, M.G., Havinga, R., Coleman, R., Kuipers, F., Jansen, P.L., Elias, E. (1999). Different pathways of canalicular secretion of sulfated and non-sulfated fluorescent bile acids: a study in isolated hepatocyte couplets and TR-rats. *J Hepatol* 31,678-684.
- 123) Paulusma, C.C., Van Geer, M.A., Evers, R., Heijn, M., Ottenhoff, R., Borst, P., Oude Elferink, R.P. (1999). Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 338,393-401.
- 124) Bruck, R., Benedetti, A., Strazzabosco, M., Boyer, J.L. (1993). Intracellular alkalinization stimulates bile flow and vesicular-mediated exocytosis in IPRL. *Am J Physiol* 265,G347-G353.
- 125) Alper, S.L. (1991). The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol* 53,549-564.
- 126) Klatskin, G. (1975). Toxic and drug-induced hepatitis. In : *Diseases of the liver*, 4th ed. (L. Schff, ed.) J.B. Lippicontt Co., Phiuladelphia, pp 604-710.
- 127) Bertrand, L., Descomps, B., Blanc, F. (1978). Sur les hepatitis médicamenteuses. *Ann Gastroentérol Hepatol* 14,283-295.
- 128) Ridder, W.E., Oehme, F.W. (1974). Nitrates as an environmental, animal and humana hazard. *Clin Toxicol* 7,145-148.

Bibliografía

- 129) Rouiller, Ch. (1964). Experimental toxic injury of the liver. In: The liver, vol II (Ch. Rowiller, ed.) Academic Press, New York, pp. 335-476.
- 130) Zimmerman, H.J. (1968). The spectrum of hepatotoxicity. *Biol Med* 12,135-138.
- 131) Schaffner, F., Raisfeld, I.H. (1969). Drugs and the liver: A review of metabolism and adverse reactions. *Advan Int Med* 15,221-233.
- 132) Albert, A. (1975). *Selective Toxicity*. Co. Londres.
- 133) Baselt, R. (1977). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Vol. 2 Preston Pub. Nueva York.
- 134) Goldstein, A., Aronow, L., y Kalamán, S. (1974). *Principles of Drug Action*. Wiley. Nueva York.
- 135) Sies, H., Mehlhorn, R., (1986). Utagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys*. 15,393-396.
- 136) Halliwell, B., Cross, C.E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 102 Suppl. 10,5-12.
- 137) Freeman, B.A., Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab invest*. 47,412-426.
- 138) Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet*. 344,702.
- 139) Cornwell, D.G., Morisaki, N. (1984). Fatty acid paradoxes in the control of cell proliferation: Prostaglandine, lipid peroxides, and

- cooxidation reactions. *Free Radicals in Biology*. Pryor, W.A. (Editor), 95,148.
- 140) Sohal, R.S., Allen, R.G., Farmer, K.J., Newton, R.K. (1985). Iron induces oxidative stress and may alter the rate of aging in the housefly. *Mech Ageing Dev.* 32,33-38.
- 141) Harman, A.W., Henry, C.A. (1987). Differences in glutathione synthesis and glutathione S-transferase activities in hepatocytes from postnatal and adult mice. *Biochem. Pharmacol.* 36,177-179.
- 142) Sohal, R.S., Allen, R.G., Nations, C. (1986). Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. *J Free Radic Biol Med.* 2,175-181.
- 143) Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227,375-381.
- 144) Markovitz, M.M., Rozen, P., Pero, R.W., Tobi, M., Miller, D.G. (1988). Hydrogen proxide induced adenosine diphosphate ribosyl transferase (ADPRT) response in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 28,1680-1686.
- 145) Leeders, H.J., Berendes, H.D.(1972). The effects of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in *Drosophila*. *Chromosoma* 37,433-444.
- 146) Hill, K.E., Burk, R.F., Lane, J.M. (1987). Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *J Nutr.* 117,99-104.

- 147) Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1978). The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54,109-160.
- 148) Meisler, M., Strahler, J., Wiebauer, K., Thomsen, K.K. (1983). Multiple genes encode mouse pancreatic amylases. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 7,39-57.
- 149) Ronco, M.T., Alvarez, M. de L., Monti, J., Carrillo, M.C., Pisani, G., Lugano, M.C., Carnovale, C. (2002). Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation during rat liver regeneration. *Molecular Medicine* 8,808-817.
- 150) Gey, K.F. (1990). Lipids, lipoproteins and antioxidants in cardiovascular dysfunction. *Biochem Soc Trans* 18, 1040-1045.
- 151) Gey, K.F, Puska, P., Jordan, P., Moser, U.K. (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 53,326S-334S.
- 152) Ferns, G.A.A., Konnch, M., Anggard, E.F. (1993). Vitamin E the evidence for an anti-atherogenic role. *Artery* 20,61-94.
- 153) Byers, T., Perry, G. (1992). Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Ann Rev Nutr.* 12,139-159.
- 154) Knekt, P. (1993). Epidemiology of vitamin E: evidence for anticancer effects in humans. In *Vitamin E in Health and Disease* (Edited by Packer L. And Fuch. J.), pp. 513-527. Dekker, New York, NY.

- 155) Halliwell, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23,118-126.
- 156) Sies, H., Murphy, M.E. (1991). Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol* 8B, 211-224.
- 157) Stadtman, E.R. (1991). Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr.* 54,1125S-1128S.
- 158) Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natn Acad Sci. U.S.A.* 85,6465-6467.
- 159) Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R., López-Torres, G.B. (1995). Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidant. *Int J Biochem Cell Biol.* 27,1175-1181.
- 160) Factor, V.M., Laskowska, D., Rugaard Jensen, M., Weitach, J.T., Popescu, N.C., Thorgeirsson, S.S. (2000). Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *PNAS.* 97, 2196-2201.
- 161) Meydani, M., Lipman, R.M., Han, S.N., Wu, d., Beharka, A., Martin, K.R., Bronson, R., Cao, G., Smith, d., Maydani, S.N. (1998). The Effect of Long-term Dietary Supplementation with Antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 854,352-360.

- 162) Prasad, K.N., Kumar, A., Kochupillai, V., Cole, W.C. (1999). High Doses of Multiple Antioxidant Vitamins: Essential Ingredients in Improving the Efficacy of Standard Cancer Therapy. *J Am Coll Nutr.* 18,13-25.
- 163) Danial, N.N., Keysmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116,205-219.
- 164) Fleys, W., Beyae't, R., Decleéq, W., Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die:apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 23,2766-2773.
- 165) Proskaryakov, S.Y., Konoplyappikov, A.G., Gabal, Y.L. (2003). Necrosis: an specific form of programmed cell death?. *Exp Cell Res* 283,1-16.
- 166) Karin, M. (1998). JNK or IKK, AP-1 or NT-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc Natl Acad Sci USA.* 95,9067-9069.
- 167) Young, M.R., Li, J.J., Rincon, M., Flayell, R.A., Sathyanarayana, B. K., Hunziker, R., Colbum, N.(1999). Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96,9827-9832.
- 168) Chen, F., Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X. (2001). Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem.* 222,183-188.

Bibliografía

- 169) Honglian, S., Laurie, G.H., Ke Jian, L. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 37 N° 5, 582-593.
- 170) Ikeda, M. (1994). Complex exposures: Potentials for assessing integrated exposures. *Clin Chem* 40:1444-1447.
- 171) Degiorgis, N.M., Itoiz, M.E., Cabrini, R.L. (1987). Modelo experimental para el estudio de las alteraciones óseas producidas por aluminio. *Actas II Congreso Osteología y Metabolismo Mineral*. Argentina. P.19.
- 172) Kubin, K. H., Grodsky, G. M., and Carbone, J. V. (1960). Investigation of rose bengal conjugation.. *Exp. Biol. Med.* 104, 650-653.
- 173) Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T. (1978). Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 6,165-175.
- 174) Richards, T.G., Tindell, V.R., Young, A. (1959). A modification of the bromosulphthalein liver function test to predict the dye content of the liver and bile. *Clin Sci.* 18,499-511.
- 175) Talalay, P. Enzymatic analysis of steroid hormones. (1960). *Methods Biochem Anal.* 8,119-143.
- 176) Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 27,502-522.

- 177) Whelan, F.J., Plaa, G.L. (1963). The application of thin layer chromatography to sulfobromophthalein metabolism studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 5,457-463.
- 178) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Ferr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193,265.
- 179) Duck-Chong, C.G., Baker, G.J., Murdoch, S.R., Price, R.M. (1984). Methods for extracting phospholipids from human amniotic fluid compared. *Clinical Chemistry.* 30,271-274.
- 180) Meier, P.J., Sztul, E.S., Reuben, A., Boyer, J.L. (1984). Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol* 98,991-1000.
- 181) Ellman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryls groups. *Arch Biochem Biophys.* 82,70-73.
- 182) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95,351-357.
- 183) Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 195,133-140.
- 184) Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70,158.

- 185) Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249,7130-7139.
- 186) Frezza, E. E., Gerunda, G. E, Plebani, A., Galligioni, A., Giacomini, A., Neri, D., and Faccioli, A. M. (1993). Effect of ursodeoxycholic acid administration on bile duct proliferation and cholestasis in bile duct ligated rat. *Dig. Dis Sci.* 38, 1291-1296.
- 187) Weibel, E. R. (1979). *Stereological methods, Vol. I: Practical Methods for Biological Morphometry.* Academic Press, London.
- 188) Sokol, R. J., McKim, J. M., Colby Goff, M., Ruyle, S. Z., Devereaux, M. W., Han, D., Packer, L., and Everson, G. (1998). Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology.* 114, 164-174.
- 189) Caballero, T., Pérez-Milena, A., Masseroli, M., O'Valle, F., Salmerón, F. J., Del Moral, R. M. G., and Sánchez-Salgado, G. (2001). Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image análisis quantification in sustained- responder and non-responder interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology.* 34, 740-747.
- 190) Sakaida, I., Nagatomi, A., Hironaka, K., Uchida, K., and Okita, K. (1999). Quantitative análisis of liver fibrosis and stellate cell changes in patients with chronic hepatitis C alter interferon therapy. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 489-496.

- 191) Gold, R., Schmied, M., and Giegerich, G. (1994). Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 71, 219-225.
- 192) Ballanti, P., Mocetti, P., Della Rocca, C., Bonucci, E., Constantini, S., Giordano, R. Ioppolo, a., Mantovani, A. (1989). Experimental aluminum intoxication and parathormone: Effects on the mineralization process. *Miner electrolyte Metab.* 15,233-240.
- 193) Martyn, C.N., Osmond, C., Edwardson, J.A., Barker, D.J.P., Harris, E.C., Lacey, R.F.(1989).Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water. *Lancet* 1,59-62.
- 194) Trapp, G.A. (1986). Interactions of aluminum with cofactors, enzymes, and other proteins. *Kidney Int* 29 (Suppl 18) 12-16.
- Ittel, T.H., Buddington, B., Miller, N.L., Alfrey, A.C. (1987). Enhanced gastrointestinal absorption of aluminum in uremic rats. *Kidney Int.* 32,821-826.
- 195) Gomez Alonso, C., Fernández Martin, J.L., Menéndez Rodríguez, P., Fernández Soto, I., Virgós, M.J., Cannata, J.B. (1990). Acúmulo de aluminio en presencia de función renal normal: Riesgo de intoxicación por vía oral. *Nefrología* 10,386-392.
- 196) Fosmire, G.J., Focht, S.J., McClearn, G.E. (1993). Genetic influences on tissue deposition of aluminum in mice. *Biol Trace Elem Res* 37,115-121.

Bibliografía

- 197) Berthof, R.L., Herman, M.M., Savory, J., Camperter, R.M., Sturgill, B.C., Katsetos, C.D., Vandenberg, S.R., Wills, M.R. (1989). A long term intravenous model of aluminum maltol toxicity in rabbits: tissue distribution, hepatic, renal, and neuronal cytoskeletal changes associated with systemic exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 98, 58-74.
- 198) Klaassen, C. D. (2002). Xenobiotic transporters: Another protective mechanism for chemicals. *Int. J. Toxicol.* 21, 7-12.
- 199) Klaassen, C.D. (1970). Plasma disappearance and biliary excretion of sulfobromophthalein and phenol-3,6-dibromophthalein disulfonate after microsomal enzyme induction. *Biochem Pharmacol.* 19,1241-1249.
- 200) Arias, I.M., Che, M., Gatmaitan, Z., Leveille, C., Nishida, T., St Pierre, M. (1993). The biology of the bile canaliculus. *Hepatology* 17, 318-329.
- 201) Lohr, J.W., Willsky, G.R., Acara, M.A. (1998). Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* 50, 107-141.
- 202) Ballatori, N., and Truong, A. T. (1992). Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am. J. Physiol.* 263, G617-G624.
- 203) Barnhar, J.L., Combes, B. (1976). Biliary excretion of dye in dogs infused with BSP or its glutathione conjugate. *Am J Physiol.* 231, 399-407.

- 204) Soriano Cabrera, S., Berdud Godoy, I., Holgado Salado, R., Martín Malo, A. (1997). Insuficiencia renal crónica: aspectos etiopatogénicos. Mecanismos fisiopatológicos. *Medicine* 7 (65), 3025-3031.
- 205) McDonald, T.L., Martin, R.B. (1988). Aluminum ion in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 8,15-19.
- 206) Savory, J., Herman, M. M., and Ghribi, O. (2003). Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *J. Inorg. Biochem.* 97, 151-154.
- 207) Campbell, A., and Bondy, S. C. (2000). Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: A role for the metal in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Biol.* 46, 721-730.
- 208) Ghribi, O., DeWitt, D. A., Forbes, M. S., Herman, M. M., and Savory, J. (2001). Co-involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis: Changes in cytochrome c, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of aluminum-treated rabbits. *Brain Res.* 903, 66-73.
- 209) Lemasters, J. J., and Nieminen, A. L. (1997). Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. *Biosci. Rep.* 17, 281-291.
- 210) Tappel, A. L. (1962). Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam. Horm.* 20, 493-510.
- 211) Esparza, J. L., Gomez, M., Romeu, M., Mulero, M., Sanchez, D. J., Mallol, J., and Domingo, J. L. (2003). Aluminum-induced pro-

- oxidant effects in rats: Protective role of exogenous melatonin. *J. Pineal Res.* 35, 32-39.
- 212) Yousef, M. I. (2004). Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199, 47-57.
- 213) El-Demerdash, F. M. (2004). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 113-121.
- 214) Abreo, K., Sella, M., Alvarez-Hernandez, X., and Jain, S. (2004). Antioxidants prevent aluminum-induced toxicity in cultured hepatocytes. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1129-1134.
- 215) Flora, S., Mehta, A., Satsangi, K., Kannan, G. M., and Gupta, M. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: Response to combined administration of citric acid and HEDTA. *Comp. Biochem. Physiol. C* 134, 319-328.
- 216) Mahieu, S. T., Gionotti, M., Millen, N., and 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.
- 217) Müller, M. (2000). Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin. Liver Dis.* 20, 323-337.

- 218) Assenat, E., Gerbal-Chaloin, S., Larrey, D., Saric, J., Fabre, J. M., Maurel, P., Vilarem, M. J., and Pascussi, J. M. (2004). Interleukin 1beta inhibits CAR induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology*. 40, 951-960.
- 219) Pascussi, J. M., Dvorak, Z., Gerbal-Chaloin, S., Assenat, E., Maurel, P., and Vilarem, M. J. (2003). Pathophysiological factors affecting CAR gene expression. *Drug Metab Rev*. 35, 255-268.
- 220) Schmitt, M., Kubitz, R., Wettstein, M., Yom Dahl, S., and Haussinger, D. (2000). Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol. Chem*. 381, 487-495.
- 221) Kubitz, R., Wettstein, M., Warskulat, U., and Haussinger, D. (1999). Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116, 401-410.
- 222) LaRusso, N. F. (1984). Proteins in bile: How they get there and what they do. *Am. J. Physiol*. 247, G199-G205.
- 223) Berlyne, G.M., Yagil, R., Ari, J.B., Knopj, F., Weinberger, G., Danovitch, G.M. (1972). Aluminum toxicity in rats. *Lancet* 1,564-568.
- 224) Zatta, P., Taylor, A., Zambenedetti, P., Milacie, R., Dell'Antone, P. (2000). Aluminum inhibits the lysosomal proton pump from rat liver. *Life Sci*. 66, 2261-2266.

Bibliografía

- 225) Kalantar-Zadeh, K., and Kopple, J. D. (2003). Trace elements and vitamins in maintenance dialysis patients. *Adv. Ren. Replace Ther.* 10, 170-182.
- 226) Cadorniga, R. (1982). Vitamins in parenteral nutrition. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 4, 141-151.