

Tesis de Posgrado

Mecanismos de acción del aluminio sobre la eritropoyesis

Vittori, Daniela Cecilia

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

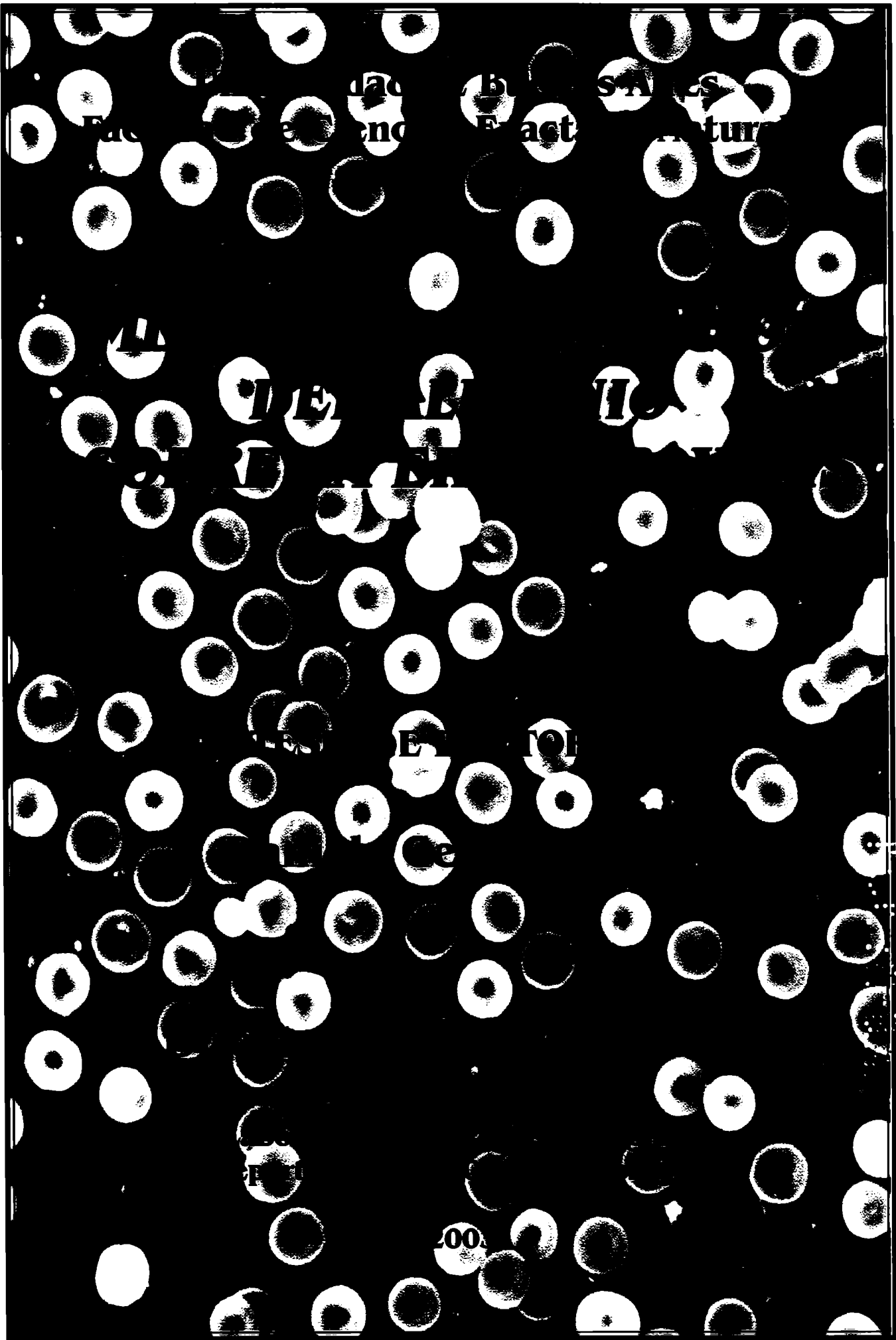
This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vittori, Daniela Cecilia. (2003). Mecanismos de acción del aluminio sobre la eritropoyesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3642_Vittori.pdf

Cita tipo Chicago:

Vittori, Daniela Cecilia. "Mecanismos de acción del aluminio sobre la eritropoyesis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3642_Vittori.pdf



Fac... end... act... nature

11... 11... 11... 11...

11... 11...

00

Agradezco a todas las personas que intervinieron de alguna manera en la realización de este trabajo, ya sea con su aporte científico o, simplemente, y lo más importante, con su compañía.

Especialmente:

A Horacio por estar siempre y apoyarme en todos los emprendimientos profesionales que inicio.

A mi familia por su confianza y estímulo constante.

A Alcira por el aporte de su conocimiento, además del tiempo y esfuerzo invertidos en mi formación.

A mis compañeros de trabajo del Área Análisis Biológicos, en especial a Gladys y Nicolás, por su amistad y apoyo diario a nivel humano y profesional.

MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE LA ERITROPOYESIS

La exposición a aluminio (Al) afecta la eritropoyesis. Sin embargo, poco se conoce acerca de las características de este efecto, así como de los mecanismos involucrados. En el presente trabajo de investigación se planteó, como primer objetivo, la necesidad de caracterizar la anemia producida por sobrecarga oral crónica con Al. Después de ocho meses de tratamiento, los animales desarrollaron anemia no ferropénica. La disminución de la concentración plasmática de haptoglobina, el aumento de reticulocitos y la presencia de esquistocitos apoyan la naturaleza hemolítica de la anemia desarrollada. A causa del tratamiento, se observó una importante inhibición del desarrollo de CFU-E en ensayos *ex vivo* de células de médula ósea. El otro signo notable fue la aparición de severas alteraciones morfológicas en eritrocitos de sangre periférica, lo que sugirió una acción directa del Al sobre las células eritroides maduras. Esa posibilidad fue corroborada en ensayos *in vitro* de eritrocitos humanos incubados en presencia del metal, en los cuales el rasgo persistente fue la desaparición de la típica forma bicóncava. El aumento de la degradación de la proteína estructural banda 3, observado junto con la detección de depósitos de Al en la membrana, apoya no sólo la estrecha relación entre la morfología celular y la estructura y organización de la membrana del eritrocito, sino también una acción directa del metal sobre componentes de la membrana. La disminuida respuesta de las células progenitoras CFU-E a la eritropoyetina (Epo), después de la exposición crónica a Al, motivó la investigación de los efectos del metal sobre mecanismos involucrados en la vía de activación del receptor para Epo (EpoR). La exposición a Al provocó disminución del EpoR a nivel de ARNm y de proteína, hallazgo que coincidió con la anulación del efecto antiapoptótico de la Epo sobre células K562. En la línea UT-7, altamente dependiente de Epo, sólo una exposición crónica a Al modificó la respuesta a la hormona. Después de esa exposición, el aumento del EpoR a nivel de ARNm y de proteína, detectado bajo condiciones de carencia de Epo, sugiere un aumento de la sensibilidad de esta línea celular al factor de crecimiento.

En conclusión, es evidente que el Al no resulta un elemento inocuo. Actúa sobre el sistema eritropoyético afectando a las células eritroides en distintos estadios de maduración. Los resultados sugieren una acción directa del metal sobre los componentes de la membrana celular de los eritrocitos maduros y un mecanismo de interferencia en distintos caminos de activación de células eritroides inmaduras mediados por la formación del complejo eritropoyetina-receptor.

MECHANISMS OF ACTION OF ALUMINUM ON ERYTHROPOIESIS

It has been demonstrated that exposure to aluminum (Al) affects erythropoiesis. Little is known, however, on the characteristics of this phenomenon, as well as on the mechanisms involved in it. The first objective of this work was to characterize the anemia caused by chronic oral exposure to Al. After eight months of treatment, animals developed anemia but showed no iron deficiency. The decrease in haptoglobin plasmatic concentration, the increase in the number of reticulocytes and the presence of schistocytes support the hypothesis of the hemolytic nature of the developed anemia. After the treatment, a significant inhibition of CFU-E development was observed in cultures of bone marrow cells. Moreover, severe morphologic alterations were observed in erythrocytes. Taking into account these alterations, the possibility that Al exerted a direct action on mature erythroid cells was evaluated. *In vitro* assays with human erythrocytes incubated with the metal showed the disappearance of the typical biconcave form as a persistent characteristic. An increase in band 3 structural protein degradation was observed, and Al deposits were detected in the membrane, thus corroborating not only the close relation between cellular morphology and the structure and organization of the erythrocyte membrane, but also the direct action of the metal in the cellular environment. The reduced response of CFU-E progenitor cells to erythropoietin (Epo) after chronic exposure to Al motivated the study of Al effects on the mechanisms involved in the activation pathway of Epo receptor (EpoR) in different cell lines. Al exposure caused the decrease of EpoR at the RNA and protein levels, which agreed with the inhibition of the antiapoptotic effect of Epo on K562 cells. In line UT-7, highly dependent on Epo, only chronic exposure to Al modified the response to the hormone. The increase of EpoR at the mRNA and protein levels, detected under conditions of Epo deprivation, showed an increase in the response of this cellular line to the growth factor due to long exposure to the metal. In conclusion, it is clear that Al is not an innocuous element. It works on the erythropoietic system affecting erythroid cells in different maturation stages. The metal is supposed to exert a direct action on the components of the cellular membrane of mature erythrocytes, and to act as an interference mechanism in different activation pathways of immature erythroid cells mediated by the formation of the erythropoietin-receptor complex.

Parte de los resultados incluidos en la presente Tesis Doctoral han dado origen a las siguientes publicaciones:

§ *Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long term ingestion of aluminium.*

Vittori D, Nesse A, Pérez G, Garbossa G.
Journal of Inorganic Biochemistry, 76:113-120, 1999.

§ *Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein.*

Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Pérez G, Nesse A.
Biochimica et Biophysica Acta, 1558:142-150, 2002.

§ *Toxicidad del aluminio sobre el sistema eritropoyético. Mecanismos involucrados.*

Pérez G, Vittori D, Garbossa G, Nesse A.
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 36:41-50, 2002.

Además, resultados parciales han sido incorporados en una revisión sobre el tema realizada por las Dras. Alcira Nesse y Graciela Garbossa, en el libro Aluminium and Alzheimer's Disease. The Science that Describes the Link, Capítulo 13:

«Aluminium Toxicity in Erythropoiesis. Mechanisms Related to Cellular Dysfunction in Alzheimer's Disease».

C. Exley (Ed.). Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2001.

Los siguientes manuscritos se encuentran en etapa de redacción:

§ *The mechanism by which aluminium affects erythropoietin involves the hormone receptor.*

Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A.

§ *Erythropoietin resistance. Role of aluminum and inflammatory mediators. Review.*

Nesse A, Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G.

Por invitación del Current Pharmaceutical Biotechnology. Tema y resumen aceptado.

§ *Aluminum and erythropoiesis. Review.*

Nesse A, Garbossa G, Vittori D, Pérez G, Pregi N.

Por invitación del Current Pharmaceutical Biotechnology. Tema y resumen aceptado.

ABC	azul brillante de Coomassie R-250
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
α -MEM	medio mínimo esencial de Eagle α -modificado
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BSA	albúmina sérica bovina
DAF	2,7 diaminofluoreno
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetil sulfóxido
Epo	eritropoyetina
EpoR	receptor para eritropoyetina
FCM	fragilidad corpuscular media
G6PD	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
m.o.	médula ósea
MEB	microscopía electrónica de barrido
MET	microscopía electrónica de transmisión
M_r (K)	masa molecular relativa (x 1000)
NC	membrana de nitrocelulosa
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
pb	pares de bases
RHuEpo	eritropoyetina recombinante humana
RT-PCR	<i>reverse transcriptase- polymerase chain reaction</i>
SBTI	inhibidor de tripsina
SEM	error estándar de la media
SFB	suero fetal bovino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
VCM	volumen corpuscular medio

ÍNDICE

V. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO.....	31
V.a. Tinción para siderocitos y sideroblastos.....	31
V.b. Ferremia.....	31
V.c. Capacidad total de fijación de hierro.....	31
V.d. Saturación de transferrina plasmática.....	32
VI. DESARROLLO DE CFU-E.....	32
VI.a. CFU-E: Unidad formadora de colonias eritroides.....	32
VI.b. Medios de Cultivo.....	32
VI.c. Obtención de células de médula ósea.....	32
VI.d. Cultivo de CFU-E.....	33
VI.e. Curva de calibración dosis-respuesta con eritropoyetina.....	33
VII. DESTRUCCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y DETERMINACIÓN DE ALUMINIO.....	34
CAPÍTULO II: ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE CÉLULAS ERITROIDES MADURAS.....	36
I. INCUBACIÓN DE ERITROCITOS <i>IN VITRO</i>	36
II. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y PROPIEDADES DE LOS ERITROCITOS.....	36
II.a. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	36
II.b. Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	37
II.c. Fragilidad osmótica.....	37
II.d. Viscosidad de la membrana.....	37
III. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO.....	38
III.a. Preparación de membranas eritrocitarias.....	38
III.b. SDS-PAGE de proteínas de membrana.....	38
III.c. Electrotransferencia e <i>immunoblotting</i>	39
IV. CONTENIDO DE ALUMINIO EN LAS FRACCIONES CELULARES.....	40
CAPÍTULO III: MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR A ERITROPOYETINA POR ACCIÓN DE ALUMINIO.....	41
I. MANTENIMIENTO Y PRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS.....	41
II. CÉLULAS PROGENITORAS ERITROIDES HUMANAS.....	42
II.a. Purificación de células progenitoras.....	42
II.b. Desarrollo de CFU-E humanas.....	42
II.c. Curva de calibración del tiempo de estimulación.....	43
II.d. Curva de calibración dosis-respuesta con eritropoyetina.....	44
III. LÍNEAS CELULARES	44
III.a. Línea celular humana eritroleucémica K562.....	44
III.b. Línea celular humana de origen leucémico UT-7.....	45
IV. RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA.....	45

IV.a. Activación de ortovanadato de sodio.....	45
IV.b. Lisis celular.....	46
IV.c. Inmunoprecipitación.....	46
IV.d. Transferencia y <i>Western blot</i>	46
IV.e. <i>Stripping</i> y <i>reprobing</i>	47
V. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO DEL RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA.....	47
V.a. Extracción de ARN total.....	47
V.b. Obtención de ADN copia.....	48
V.c. Diseño de <i>primers</i>	48
V.d. Amplificación de los fragmentos de ADNc por PCR.....	49
V.e. Análisis de los productos de amplificación.....	50
V.f. Precauciones para mantener la calidad del procedimiento.....	50
VI. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DE LA ERITROPOYETINA	50
<i>TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</i>	52
<i>DESCARTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y RESIDUOS PELIGROSOS</i>	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53-113
CAPÍTULO I: <i>EFFECTO CRÓNICO DEL ALUMINIO IN VIVO</i>	54
PESO CORPORAL. FUNCIÓN RENAL.....	54
DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS.....	55
PARÁMETROS INDICADORES DE HEMÓLISIS INTRAVASCULAR.....	55
MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	56
DESARROLLO DE CFU-E.....	60
TRANSPORTE Y DEPÓSITOS DE HIERRO.....	61
ALUMINIO EN EL ORGANISMO.....	64
Aluminio en plasma y tejidos.....	64
Aluminio intracelular.....	66
DISCUSIÓN.....	72
CAPÍTULO II: <i>ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE CÉLULAS ERITROIDES MADURAS</i>	78
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO.....	78
ESTRUCTURA DE ERITROCITOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO.....	79

PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE GLÓBULOS ROJOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO.....	84
Perfil proteico por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	84
Detección de banda 3 y espectrina por <i>Western blott</i>	85
FRAGILIDAD OSMÓTICA Y VISCOSIDAD DE ERITROCITOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO.....	86
CONTENIDO DE ALUMINIO EN ERITROCITOS ENVEJECIDOS <i>IN VITRO</i>	87
DISCUSIÓN.....	89
CAPÍTULO III: MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR A ERITROPOYETINA POR ACCIÓN DE ALUMINIO.....	94
ACCIÓN DE ALUMINIO SOBRE LA RESPUESTA A ERITROPOYETINA DE CÉLULAS PROGENITORAS ERITROIDES HUMANAS.....	94
ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE LA RESPUESTA A ERITROPOYETINA DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS.....	96
Crecimiento celular inducido por eritropoyetina.....	96
Acción del aluminio sobre la función antiapoptótica de la eritropoyetina.....	98
Efecto del aluminio sobre la expresión del receptor para eritropoyetina en células K562.....	101
Niveles de ARNm del receptor para eritropoyetina en células K562 expuestas a aluminio.....	103
Efecto del aluminio sobre la proliferación inducida por eritropoyetina en células UT-7.....	104
Expresión del receptor para eritropoyetina en células UT-7 expuestas a aluminio.....	105
Modulación del ARNm del receptor para eritropoyetina en células UT-7 expuestas a aluminio.....	106
DISCUSIÓN.....	109
CONSIDERACIONES FINALES.....	114-118
BIBLIOGRAFÍA.....	119-129

TABLAS

Tabla 1.	Condiciones experimentales para la destrucción de materia orgánica tisular.....	35
Tabla I.1.	Parámetros hematológicos.....	55
Tabla I.2.	Parámetros indicadores de hemólisis intravascular.....	56
Tabla I.3.	Metabolismo del hierro.....	61
Tabla I.4.	Contenido de aluminio en plasma y tejidos.....	64

FIGURAS

Figura 1.	Diagrama esquemático de hematopoyesis.....	2
Figura 2.	Diagrama esquemático del desarrollo y maduración del eritrocito en médula ósea.....	4
Figura 3.	Diagrama esquemático del modelo propuesto para la unión del citoesqueleto del eritrocito a la membrana plasmática.....	6
Figura 4.	Micrografía electrónica de una porción del citoesqueleto del eritrocito.....	7
Figura 5.	Esquema de la estructura de eritropoyetina.....	10
Figura 6.	Esquema del camino de señalización intracelular del complejo Epo-EpoR.....	12
Figura I.1.	Efecto de la administración de aluminio sobre la morfología de eritrocitos de sangre periférica observados por MEB.....	58
Figura I.2.	Efecto de la administración de aluminio sobre la morfología de eritrocitos de sangre periférica observados por MEB.....	59
Figura I.3.	Efecto de la administración de aluminio sobre la respuesta de CFU-E a eritropoyetina.....	60
Figura I.4.	Investigación de depósitos de hierro en médula ósea.....	63
Figura I.5.	Concentración de aluminio en plasma y tejidos.....	65
Figura I.6 a I.10.	Detección de aluminio intracelular (EDAX).....	67-71
Figura II.1.	Morfología de eritrocitos humanos incubados <i>in vitro</i> en presencia de aluminio.....	80
Figura II.2.	Morfología de eritrocitos humanos incubados <i>in vitro</i> en presencia de aluminio (MEB).....	81

Figura II.3.	Morfología de eritrocitos humanos incubados <i>in vitro</i> en presencia de aluminio (MEB).....	82
Figura II.4.	Estructura de eritrocitos humanos incubados <i>in vitro</i> en presencia de aluminio (MET).....	83
Figura II.5.	SDS-PAGE de las proteínas de membrana de eritrocitos humanos incubados con aluminio.....	84
Figura II.6.	<i>Immunoblots</i> de proteína banda 3 de eritrocitos tratados con aluminio.....	85
Figura II.7.	Contenido de aluminio en membrana y citosol del eritrocito.....	88
Figura II.8.	Esquema de la acumulación diferencial de compuestos en la membrana del eritrocito.....	90
Figura II.9.	Esquema de los fragmentos resultantes por proteólisis de banda3	91
Figura III.1.	Efecto del aluminio sobre la respuesta a eritropoyetina de células progenitoras eritroides humanas.....	95
Figura III.2.	Dependencia de las líneas celulares a eritropoyetina.....	97
Figura III.3.	Acción del aluminio sobre la función antiapoptótica de eritropoyetina en células K562.....	99
Figura III.4.	Protección antiapoptótica de células UT-7 por efecto de eritropoyetina.....	100
Figura III.5.	Expresión y fosforilación del EpoR en células K562 cultivadas en presencia de aluminio.....	101
Figura III.6.	Niveles de ARNm del EpoR de células K562 expuestas a aluminio.....	103
Figura III.7.	Proliferación de células UT-7 expuestas a aluminio en respuesta a eritropoyetina.....	104
Figura III.8.	Expresión y fosforilación del EpoR en células UT-7 expuestas a aluminio.....	106
Figura III.9.	Modulación del ARNm del EpoR de células UT-7 expuestas a aluminio.....	107

DUCCIÓN

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es la serie de eventos concatenados que se inician con la proliferación y continúan con la diferenciación y maduración celular, culminando con la producción de células sanguíneas. Se considera a la proliferación como el proceso de replicación, mientras que la diferenciación está definida como la secuencia de eventos genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos que le confieren potencialidad para determinada función.

Todas las células sanguíneas son generadas en la médula ósea a partir de una única célula, *stem cell* (Fig. 1). Las propiedades que definen a esta población celular son la capacidad de autoduplicación, de la que resultan progenies con las mismas características que la célula primitiva, y la pluripotencialidad. Esta última le permite a las células dar origen a todos los elementos formes de la sangre, tales como eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, plaquetas y células del linaje linfoide.

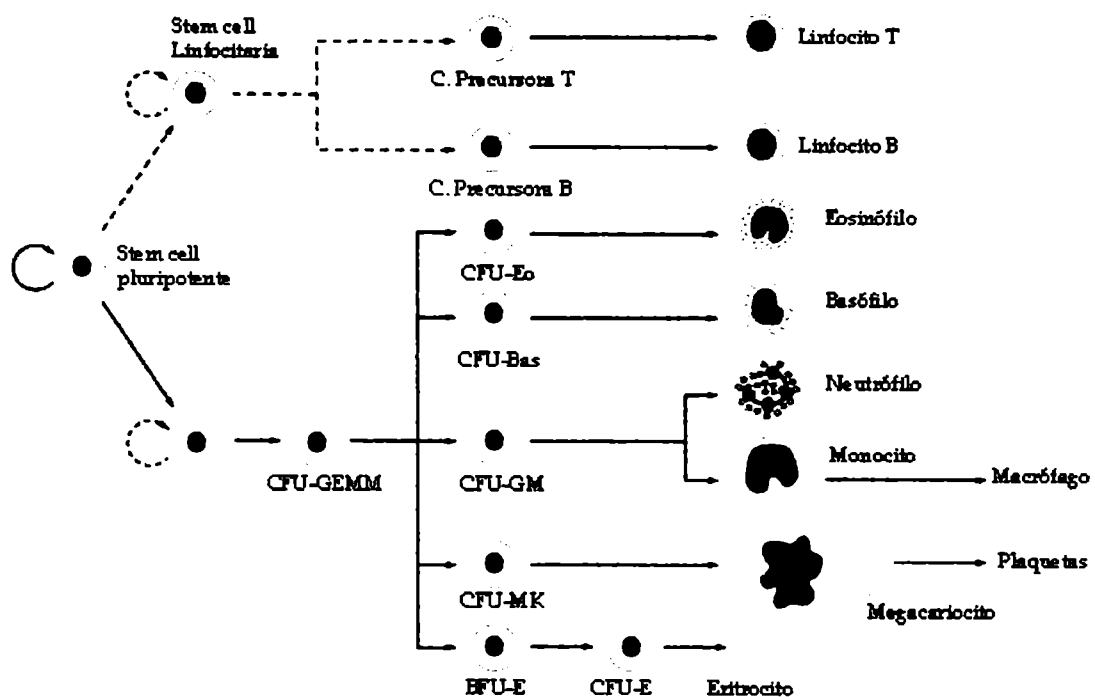


Figura 1
Diagrama esquemático de hematopoyesis
Adaptada de Alberts et al, 1994.

Las *stem cells* pluripotentes, en respuesta a diferentes estímulos, se diferencian originando células progenitoras, las que al dividirse y diferenciarse pierden gradualmente su multipotencialidad y su capacidad de proliferación. Este proceso de diferenciación es irreversible; la célula una vez diferenciada no puede volver a un estadio previo.

A partir de la *stem cell*, se desarrollan tres tipos de poblaciones celulares: células progenitoras multipotentes, células progenitoras bi o monopotentes, comprometidas hacia una o dos líneas hematopoyéticas mieloides, y células en vías de maduración. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis en la hematopoyesis se basa en un perfecto equilibrio entre proliferación y diferenciación de estas poblaciones celulares.

ERITROPOYESIS

La eritropoyesis forma parte de la hematopoyesis y se refiere al proceso que, comenzando en médula ósea, conduce a la formación de eritrocitos. La transformación de una *stem cell* pluripotente en reticulocito involucra al menos doce etapas de replicación (Jelkmann, 1986).

En la ontogenia eritropoyética, la unidad formadora de *burst*-eritroide (BFU-E) antecede a la unidad formadora de colonia-eritroide (CFU-E), ambas células progenitoras. Al igual que la *stem cell*, BFU-E y la CFU-E circulan en sangre periférica, aunque en muy baja concentración. La célula progenitora CFU-E da origen a cuatro estadios de maduración: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo y eritroblasto ortocromático, todos ellos distinguibles morfológicamente (Fig. 2).

La función crítica de la célula eritroide durante su maduración es la síntesis de hemoglobina. Este proceso, programado desde la etapa de proeritroblasto con la producción de cadenas globínicas, se inicia a partir del estadio de eritroblasto basófilo, incrementándose a medida que avanza la maduración para cesar en la etapa de reticulocito.

Después de cuatro divisiones celulares, el núcleo del eritroblasto ortocromático se vuelve picnótico e incapaz de sintetizar ADN y, por ende, estas células dejan de dividirse. Los cambios bioquímicos característicos de la última etapa de maduración incluyen una disminución de la síntesis de ARN en la etapa de eritroblasto ortocromático, y anulación completa de la misma cuando el reticulocito expulsa sus

restos nucleares.

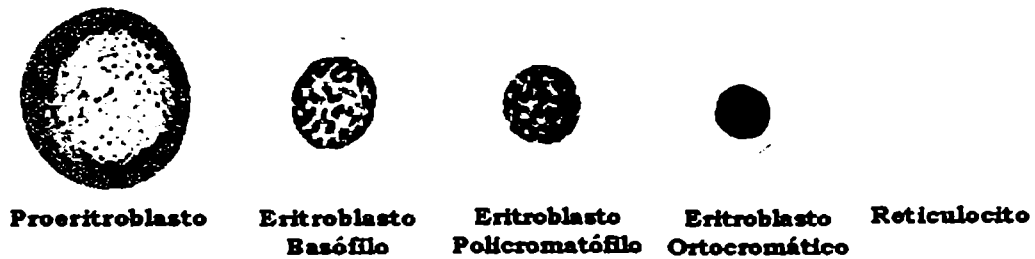


Figura 2.

Diagrama esquemático del desarrollo y maduración del eritrocito en médula ósea

Adaptada de Meyer & Harvey, 1998.

En el reticulocito comienza la desaparición gradual de partículas ribosomales y mitocondriales, transformándose en eritrocito. Esta transición involucra pérdida de volumen y de superficie de la célula eritroide.

GLÓBULO ROJO

Metabolismo y función del eritrocito

El eritrocito constituye un vehículo para la hemoglobina, que es la encargada de transportar oxígeno y dióxido de carbono en la sangre. La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno está modulada por la concentración de fosfatos, especialmente, por la del 2,3-difosfoglicerato, por la presión parcial de oxígeno, la temperatura y el pH del medio. La capacidad de la hemoglobina para enlazar oxígeno está relacionada con la presencia de cuatro grupos prostéticos hemo en la molécula, cada uno de los cuales porta un átomo de hierro. Los átomos de hierro en estado ferroso tienen seis enlaces de unión, cuatro para los nitrógenos pirrólicos del hemo, uno para el nitrógeno imidazólico de histidina de cada cadena globínica y uno que se une reversiblemente al oxígeno.

El eritrocito sufre cambios metabólicos graduales durante aproximadamente 120 días, al término de los cuales la célula es eliminada de circulación. Los eritrocitos senescentes tienen un área superficial más pequeña y mayor concentración media de

hemoglobina celular, comparados con las células más jóvenes. Además, los eritrocitos envejecidos pierden ácido siálico de sus membranas, exponiendo una asialoglicoforina. Al reconocerse este antígeno senescente, se induce la síntesis de un anticuerpo. Tras la unión del autoanticuerpo con el antígeno, la célula senescente es reconocida y eliminada de circulación por el sistema retículo endotelial (Nelson & Davey, 1993).

Una vez que el hematíe desaparece de circulación, la hemoglobina liberada por la lisis del eritrocito se combina con haptoglobina. Este complejo es captado por el sistema retículoendotelial, donde la hemoglobina es degradada en sus tres constituyentes, hierro, protoporfirina y globina. El hierro queda depositado y puede ser empleado nuevamente. Las cadenas polipeptídicas son degradadas e incorporadas a la reserva de aminoácidos del organismo. El anillo de protoporfirina se desdobla; ésta es convertida en bilirrubina y extraída del plasma por la célula hepática para su excreción por la bilis. Este sistema de degradación explica por qué el nivel de haptoglobina disminuye, generalmente, después de una crisis hemolítica.

Entre la formación y la destrucción de los hematíes en la sangre existe, normalmente, un estado de equilibrio, con lo que se mantiene de manera bastante constante la masa hemoglobínica en circulación. La anemia surge cuando un aumento en la eliminación de hematíes no puede ser compensado por un aumento de la producción, cuando disminuye la oferta de hematíes o la síntesis de hemoglobina, o cuando los dos procesos ocurren a la vez. Cuando se desarrolla anemia, la hipoxia resultante de los tejidos induce la producción de eritropoyetina, estimulándose la producción de eritroblastos que conduce a un mayor número de eritrocitos en circulación. Para determinar los mecanismos de una anemia, a menudo es necesario evaluar el grado de eritropoyesis eficaz (producción y liberación de hematíes a circulación), eritropoyesis ineficaz y la destrucción de los eritrocitos.

Morfología del eritrocito

La morfología normal de disco bicóncavo del hematíe se debe a que posee un exceso de superficie en relación al volumen, lo que explica que la hemoglobina se halle más concentrada en la periferia que en la parte central de la célula. Este hecho facilita la difusión de oxígeno y dióxido de carbono hacia las células y maximiza la probabilidad de unión con las moléculas de hemoglobina. La elevada relación entre superficie y volumen celular, junto con el contenido hemoglobínico y las propiedades viscoelásticas de la membrana, constituyen los tres factores principales que

determinan la capacidad del eritrocito para deformarse, atravesar la microcirculación y resistir las turbulencias que se producen en los grandes vasos. La deformabilidad es una propiedad importante, decisiva para la supervivencia de los hematíes en la circulación sanguínea (Vives Corrons, 1992). Esto es particularmente relevante ya que el diámetro de los glóbulos rojos es de, aproximadamente, 8 μm , mientras que los capilares a través de los cuales deben circular tienen entre 2 y 3 μm de diámetro.

La membrana juega un rol crítico en la determinación de la forma y en la capacidad de deformación del eritrocito. Por eso, una modificación de la membrana tal que altere la morfología puede traducirse en un acortamiento de la vida media del glóbulo rojo.

Desde el punto de vista estructural, la membrana plasmática del hematíe no difiere esencialmente de otras membranas biológicas y, en principio, está constituida por la bicapa lipídica, dos capas monomoleculares de lípidos unidos por sus extremos hidrofóbicos, en cuyo interior se encuentran incluidas numerosas proteínas integrales (Fig. 3).

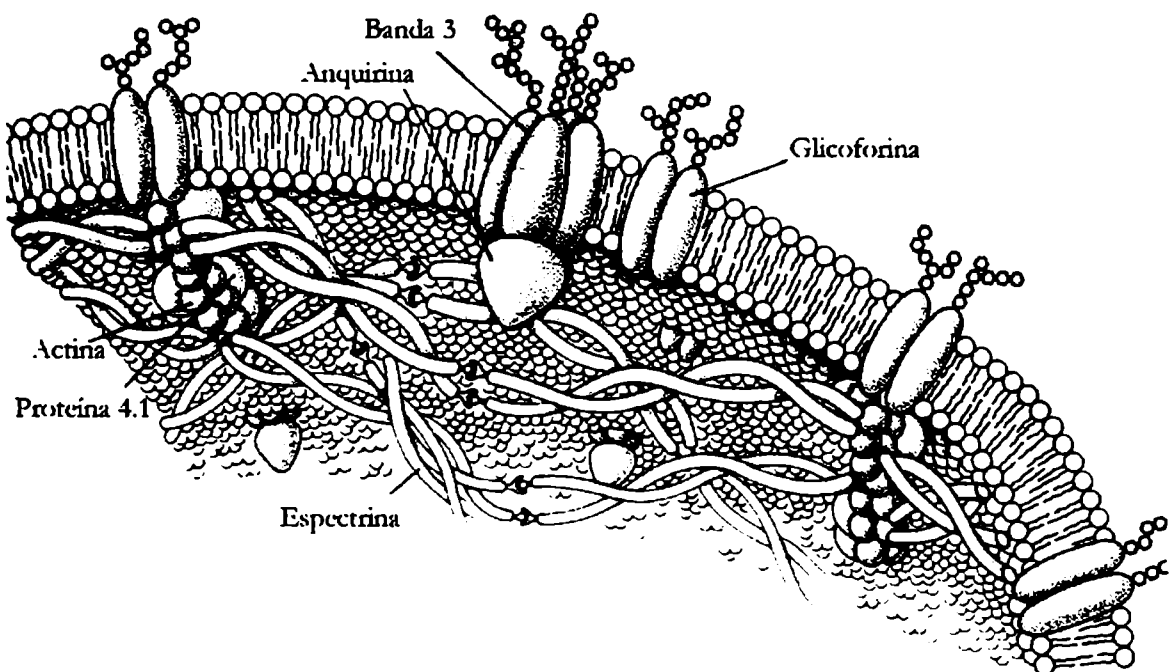


Figura 3

Diagrama esquemático del modelo propuesto para la unión del citoesqueleto del eritrocito a la membrana plasmática

La espectrina está unida a la proteína banda 3 a través de anquirina, y a la glicoforina mediante la proteína 4.1, la cual también se une al filamento de actina.

Adaptada de Stryer, 1996.

La proteína integral más abundante es la proteína transportadora aniónica, que contribuye al intercambio de iones cloro y bicarbonato entre el interior y el exterior del eritrocito. Esta proteína, de elevada M_r (90 K), denominada banda 3 por su desplazamiento electroforético (Fairbanks *et al*, 1971), atraviesa la bicapa lipídica diez veces. La banda 3 junto con la glicoforina cumplen una función importante en la fijación del esqueleto de la membrana a la bicapa lipídica.

Otras proteínas integrales son las sialoglicoproteínas, entre las que se destacan las glicoforinas (alfa, beta, gamma, delta). Las cadenas de hidratos de carbono, que afloran hacia el exterior de la bicapa, contribuyen a determinar los sustratos antigénicos de los grupos sanguíneos.

Por otro lado, las proteínas periféricas, que constituyen el citoesqueleto, se encuentran en el citoplasma formando una red bidimensional en íntimo contacto con la hemoglobina y la bicapa lipídica. Esta red está formada por diferentes proteínas, tales como espectrina, tetrámero que establece unión entre sí para formar la base estructural, junto con actina, anquirina, proteína 4.1, proteína 4.2, proteína 4.9, aducina y el grupo de miosina y tropomiosina (Fig.4).



100 nm
(1000 Å)

Figura 4
Micrografía electrónica de una porción del citoesqueleto del eritrocito
Se observan redes de espectrina y otras moléculas proteicas.
Adaptada de Stryer, 1996.

La relación funcional de las proteínas entre sí y con la bicapa lipídica se ha establecido a partir del modelo que considera la existencia de dos tipos de uniones proteicas: horizontales y verticales. Las uniones horizontales son las que se establecen entre las proteínas del esqueleto, mientras que las verticales son las que se establecen entre las proteínas del esqueleto y las proteínas integrales de membrana. Las uniones horizontales contribuyen a la estabilidad global del esqueleto y las verticales a fijar el esqueleto a la bicapa.

La bicapa lipídica junto con las proteínas de transmembrana aíslan y regulan en forma química el interior celular y la red esquelética provee un soporte rígido y estabilidad a la interfase de la bicapa, aumentando, así, la capacidad del eritrocito para cambiar de forma (Mohandas & Chasis, 1993).

ERITROPOYETINA

Factores de crecimiento que regulan el sistema eritropoyético

Junto con inhibidores, diversos factores de crecimiento regulan el sistema hematopoyético. Dependiendo de los estadios de maduración celular, los factores de crecimiento pueden actuar de tres maneras: controlando la tasa de división y el número de ciclos que las células progenitoras atraviesan antes de diferenciarse, favoreciendo la diferenciación, o incrementando la probabilidad de supervivencia celular.

De acuerdo con su acción biológica, los factores de crecimiento eritropoyéticos han sido clasificados en factores directos, los que estimulan por sí mismos a los progenitores, y en factores sinérgicos, los que potencian la acción o estimulan la producción de los factores directos. Dentro de los factores directos de crecimiento se encuentran eritropoyetina, IL-3, factor estimulante de colonias-macrófago (M-CSF) y factor estimulante de colonias-granulocito-macrófago (GM-CSF). Dentro de los sinérgicos, se encuentran IL-1, IL-4 y dos factores directos que también actúan en forma sinérgica, M-CSF y GM-CSF.

Eritropoyetina

La eritropoyetina es el principal factor de regulación de la producción de células rojas de la sangre. Tiene tres efectos sobre sus células *target*. Promueve proliferación y diferenciación de progenitores eritroides (Krantz, 1991), mientras previene de muerte celular programada (Koury & Bondurant, 1990). Su acción biológica más importante ocurre a nivel de células progenitoras eritroides BFU-E y CFU-E, aunque se han detectado receptores específicos para la hormona en células de diferentes tejidos, suministrando evidencia de las funciones autocrina, paracrina y endocrina de la eritropoyetina.

El gen de eritropoyetina se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q11-q22 y codifica una proteína de 193 aminoácidos. Una modificación post-traducciona genera un corte de los 27 aminoácidos N-terminales y la acción de una carboxipeptidasa provoca la pérdida de la arginina C-terminal (residuo 166). Luego de estas dos modificaciones se obtiene una proteína madura de 165 aminoácidos (Mulcahy, 2001). Dos puentes disulfuro unen cisteínas en posición 7-161 y 29-33 (Fig 5). La estructura terciaria está definida por cuatro α -hélices antiparalelas con *loops* colindantes.

La regulación oxígeno dependiente de la expresión del gen de eritropoyetina es aún motivo de estudio. Se han descrito caminos de señalización que involucran varias quinasas, fosfatasas y diversos factores de transcripción. Recientemente se ha postulado que la expresión del gen de eritropoyetina está controlada por el factor de transcripción HIF-1, inducible por hipoxia (Fisher, 2003).

La hormona activa de 165 aminoácidos, tiene una M_r de 18,4 K excluyendo los carbohidratos y de 34 K si está glicosilada (Roberts & Smith, 1994).

La eritropoyetina es producida por el riñón y el hígado, siendo considerado este último el sitio predominante durante la vida fetal. Después del nacimiento, el 90% de la producción de eritropoyetina se efectúa en las células intersticiales peritubulares de la corteza renal, como respuesta a un estímulo de hipoxia previo. El 10% restante continúa generándose en el hígado (Donato *et al*, 1996; Fisher, 2003).

La obtención de eritropoyetina humana con alto grado de pureza a partir de orina y plasma (Miyake *et al*, 1977) llevó al conocimiento de su secuencia aminoacídica. Mediante técnicas de ingeniería genética, se logró insertar el gen clonado de eritropoyetina humana en células de mamífero. Así, se obtuvieron líneas celulares productoras, a gran escala, de eritropoyetina recombinante humana (rHuEpo) con

una potente actividad biológica (Lin *et al*, 1985).

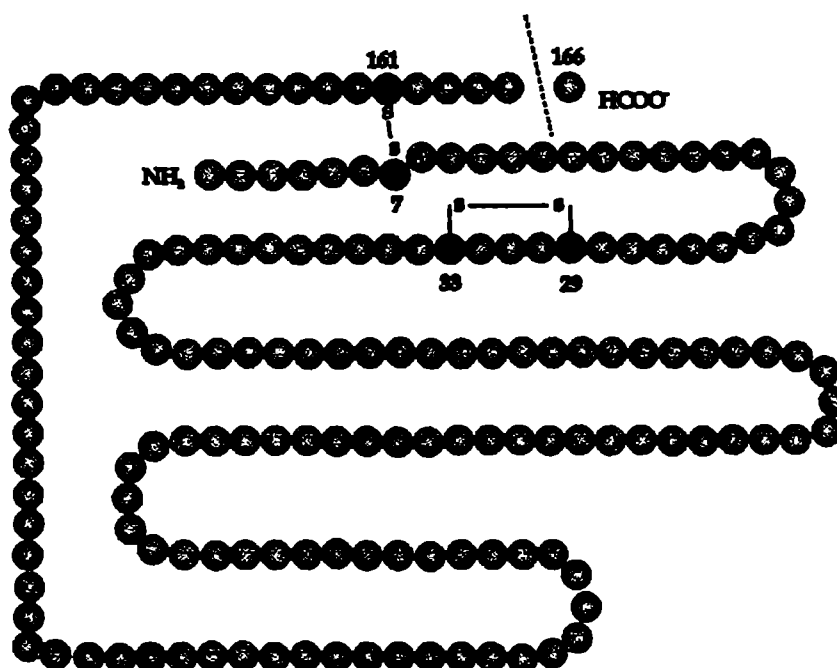


Figura.5
Esquema de la estructura de eritropoyetina

La eritropoyetina endógena y la rHuEpo son bioquímicamente idénticas, con igual secuencia de proteínas, actividad biológica y reactividad inmunológica (Abels & Rudnick, 1991). Los residuos de carbohidrato no son requeridos para la actividad biológica o la especificidad celular de ninguna de las dos, pero como en otras glicoproteínas del plasma, sirven para impedir su eliminación prematura de la circulación. Es así como, la eritropoyetina carente de ácido síalico es rápidamente eliminada del plasma por el hígado a través de sus glucoreceptores (Spivak, 1989).

La rHuEpo fue utilizada por primera vez en pacientes con insuficiencia renal crónica, ya que una de las causas de la anemia asociada a esta patología es una marcada disminución de la síntesis renal de eritropoyetina. En 1987, Eschbach y colaboradores publicaron los resultados del tratamiento con rHuEpo en la primera serie de pacientes en hemodiálisis crónica, demostrando la eficacia de la hormona para corregir la anemia. Actualmente, la rHuEpo es utilizada en el tratamiento de pacientes con trasplante de médula ósea y, además, en pacientes con anemia asociada a procesos crónicos (SIDA, y artritis reumatoide) o a tumores y mielodisplasias (Abels & Rudnick, 1991; Spivak, 1993). A pesar del éxito de esta terapéutica, casos clínicos muestran

resistencia al tratamiento con rHuEpo, la cual ha sido asociada a la presencia concomitante de procesos inflamatorios (Goicoechea *et al*, 1998; MacDougall & Cooper, 2002; Kalantar-Zadeh *et al*, 2003).

Existen varias líneas de evidencia indicando que la acción de la eritropoyetina no está restringida solamente al compartimiento eritroide. La detección de receptores para eritropoyetina en numerosos tipos celulares no eritroides han llevado a una revisión del rol biológico de la hormona. Se ha reportado que la interacción hormona-receptor induce distintas respuestas celulares, incluyendo mitogénesis, angiogénesis, movilización intracelular de calcio e inhibición de apoptosis (Lappin *et al*, 2002).

RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA

El receptor para eritropoyetina (EpoR) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas, entre los que se incluyen los correspondientes a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-7.

El nivel de expresión de EpoR en células de médula ósea es más elevado en progenitores hematopoyéticos no comprometidos con un linaje, mientras que la densidad de antígeno disminuye a medida que las células maduran. Dentro del linaje eritroide, el EpoR ha sido detectado en BFU-E. El número aumenta a medida que las células se diferencian y alcanza un máximo de, aproximadamente, 1300 moléculas por célula en los estadios de CFU-E y de proeritoblasto (Wickrema *et al*, 1992).

El receptor está compuesto por dos dominios anclados en la membrana celular. El dominio extracelular es el sitio de unión de la eritropoyetina y el dominio citoplasmático, el responsable de la señalización intracelular.

En lo que respecta al tamaño molecular del receptor para eritropoyetina, existe aún una gran controversia. Utilizando la técnica de *cross-linking* con eritropoyetina marcada radioactivamente se han detectado polipéptidos de M_r entre 65 y 105 K. Se ha propuesto al polipéptido de 65- 66 K como el producto del EpoR clonado (Youssofian *et al*, 1993). Otros polipéptidos de entre 62 y 78 K han sido reconocidos por el anticuerpo específico y se cree que son distintas formas fosforiladas del receptor (Sawyer & Hankins, 1993).

La unión de eritropoyetina inicia una cascada de eventos que lleva a la dimerización de los receptores y transactivación de la proteína kinasa 2 de la familia Janus, Jak2, asociada constitutivamente al EpoR (Witthuhn *et al*, 1993). Esta proteína activada

fosforila los 8 residuos de tirosina que se encuentran en los dominios distal y citoplasmático del EpoR. A su vez, estos residuos de fosfotirosina proveen sitios de anclaje para proteínas de señalización intracelular que contienen dominios con homología Src (SH2) como, por ejemplo, SHP1, SHP2, fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K), Ras/proteína mitógeno activadas (MAP) y el transductor de señales y activador de la transcripción STAT5 (Fig. 6).

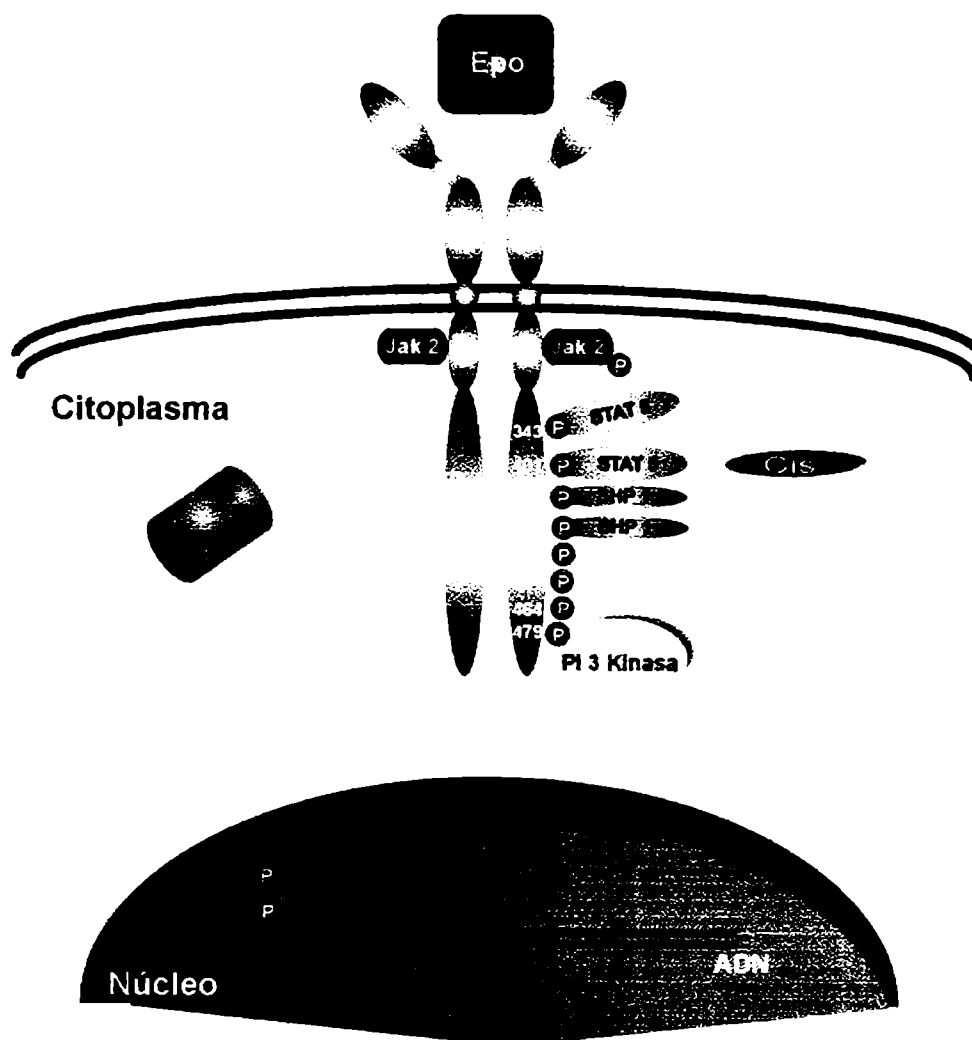


Figura 6
Esquema del camino de señalización intracelular del complejo Epo-EpoR

Los dos primeros residuos de tirosina (Tyr 343 y Tyr 401) son responsables del anclaje y posterior activación de STAT5, la cual resulta en la formación estable de dímeros STAT. Estos complejos se translocan al núcleo donde se unen a secuencias regulatorias específicas y activan la transcripción de sus genes *target* (Mulcahy, 2001).

Así como la fosforilación es el evento que inicia la señalización del EpoR, la desfosforilación regula negativamente la actividad del receptor. De hecho, los caminos regulatorios negativos que llevan a la terminación de la señalización intracelular se encienden simultáneamente por acción de eritropoyetina. Por ejemplo, se ha demostrado que la fosfotirosina fosfatasa SHP1 está involucrada en este proceso. Esta fosfatasa se asocia con la Tyr 429 del EpoR y conduce a la desfosforilación de Jak2 (Lacombe & Mayeux, 1998).

Existen otros mecanismos de regulación negativa de la activación del EpoR inducida por eritropoyetina. Uno de ellos consiste en la internalización y degradación del receptor activado. Este camino proteolítico involucra al proteasoma, una unidad multimérica que degrada proteínas. La unión del ligando al receptor parecería inducir la poliubiquitinación y la degradación del receptor por el proteasoma, ya que en ensayos con inhibidores de proteasomas se observó una prolongación de la vida media del EpoR (Verdier *et al*, 1998; Verdier *et al*, 2000). También se demostró regulación negativa por un mecanismo que involucra a la proteína Cis1, perteneciente a la familia de los factores proteicos Cis/Socs/JAB. Esta proteína Cis 1 se une al mismo sitio de anclaje que STAT5, la Tyr 401, por lo que se ha propuesto que atenúa la señal proliferativa desencadenada por ese factor de transcripción (Wojchowski, 1999).

ALUMINIO

BIODISPONIBILIDAD

El aluminio es un elemento ubicuo usado extensamente en la vida contemporánea debido a su elevada conductividad térmica y eléctrica, baja densidad y gran resistencia a la corrosión. A pesar de su amplia distribución en el medio, la evolución no le ha conferido utilidad conocida en los sistemas biológicos. Por el contrario, son cada vez más numerosas las referencias a los efectos tóxicos que han sido demostrados en plantas, animales acuáticos y animales de experimentación, y de los que, bajo ciertas condiciones clínicas, no están exentos los seres humanos.

El aluminio es un metal perteneciente al grupo IIIA de la Tabla Periódica, que presenta un estado de oxidación +3. Además de formar compuestos con materia orgánica, el aluminio se encuentra en el medio en forma de silicatos, óxidos e hidróxidos en conjunto con otros metales. No se lo encuentra como metal libre por su elevada

reactividad, ya que la exposición al agua, al oxígeno o a otros oxidantes conduce a la formación de una capa superficial de óxido de aluminio que confiere al metal una gran resistencia a la corrosión.

En cuanto a la interacción del aluminio con sistemas biológicos, la misma resulta de tal complejidad que es una de las razones que han dificultado las investigaciones. La absorción, excreción y depósito en los tejidos depende de las propiedades de los complejos que forme el ion aluminio con ligandos biológicos. Desafortunadamente, los intentos por describir la cinética de la formación de estos complejos se han visto, generalmente, frustrados por la tendencia a hidrolizarse que presentan ambos, el ion libre Al^{3+} y los complejos de aluminio.

Es importante destacar que tanto la solubilidad como la especiación del aluminio inorgánico son altamente dependiente del pH, mientras que la solubilidad de los complejos orgánicos está relacionada con el nivel de materia orgánica disuelta. En soluciones acuosas bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 5$) existe la forma octaédrica hexahidratada $\{\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6\}^{3+}$, usualmente abreviada Al^{3+} . A medida que aumenta el pH de la solución, las especies solubles sufren sucesivas deprotonaciones formándose, gradualmente, $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Al}(\text{OH})_3$. A $\text{pH} > 6,2$ la especie soluble predominante es la forma tetraédrica aluminato $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ (Suwalsky *et al*, 2002).

La especie capaz de reaccionar con ligandos inorgánicos, orgánicos o proteínas en el medio intra y extracelular, es el aluminio libre no hidrolizado Al^{3+} (Martin, 1986). Por lo tanto, es la concentración de esta especie, y no la del aluminio total, la que se considera, actualmente, crítica en la evaluación de la toxicidad del metal.

En el plasma sanguíneo, los ligandos principales son el citrato, entre los de baja M_r (Fatemi *et al*, 1991) y la transferrina, entre las proteínas (Trapp, 1983; Martin, 1986). En ausencia de citrato, o cuando el pH del entorno es más ácido, el fosfato inorgánico (Martin, 1986; Venturini & Berthon, 1989) y el ATP (Exley & Birchall, 1992) también tienen elevada afinidad por aluminio. La transferrina es responsable del 60% del transporte de aluminio ingresado al organismo humano, la albúmina transporta el 34%, correspondiendo, el resto al anion citrato (Fatemi *et al*, 1991).

La biodisponibilidad y, en consecuencia, la toxicidad del aluminio, dependen de la identidad química presente y de la capacidad de los ligandos del medio para interferir en la esfera de hidratación del ion metálico.

FUENTES DE EXPOSICIÓN

EXPOSICIÓN AMBIENTAL

El aluminio constituye cerca del 8% de la superficie terrestre. Además, la acción antropogénica tiende a modificar la forma química en la que el aluminio se encuentra en la naturaleza e incrementa su biodisponibilidad potencial, convirtiéndolo en un elemento tóxico o perjudicial para la salud (Cox, 1995; Exley & Birchall, 1992). De hecho, se encuentran concentraciones más elevadas en zonas cercanas a los sitios de desecho de algunas industrias (Nayak, 2001).

Los procesos naturales y las actividades humanas (minería y agricultura) agregan continuamente partículas de aluminio al ambiente. La concentración del metal en el agua natural generalmente es baja, sin embargo, la acidificación del suelo, en particular por precipitaciones ácidas, libera aluminio disolviéndolo. De esta manera, aumenta su disponibilidad en las corrientes de agua (Harris *et al*, 1996).

EXPOSICIÓN DIETARIA

La exposición no ocupacional a aluminio se produce principalmente a través de la ingestión de agua y alimentos. Varios tipos de vegetales contienen aluminio, ya que crecen en suelos en los cuales las concentraciones del metal son elevadas. Cuando el pH del suelo es menor que 5,0, el aluminio se solubiliza y es absorbido por las raíces de las plantas (Exley & Birchall, 1992).

Por otra parte, se ha reportado que los aditivos agregados a los alimentos pueden contribuir con cantidades que superan 1 mg Al/ración (Pennington & Schoen, 1995). Las sales de aluminio no sólo son agregadas durante el proceso de elaboración industrial de algunas frutas, quesos y cerveza sino que constituyen, además, componentes habituales de los polvos de hornear, aditivos y conservantes alimentarios.

El proceso de potabilización del agua incluye una etapa de clarificación química con aluminato de sodio, aluminato de amonio o sulfato de aluminio (Busler, 1979). Con estos compuestos se promueve la precipitación de hidróxido de aluminio con adsorción de la turbiedad, mientras que el exceso de ion Al^{3+} permanece en solución (Hem, 1986). El agua de la red urbana puede contener trazas del catión en estado libre y en forma de distintos complejos orgánicos. Suponiendo que las cañerías de

distribución no contribuyen a aumentar las concentraciones de aluminio, las determinaciones realizadas en la planta potabilizadora indican concentraciones de aluminio bajas, del orden de 10^{-6} mol/l (Martyn *et al*, 1989; Trapp, 1986), con variaciones según el lugar geográfico de origen del agua de bebida. Por ello, se considera que la ingesta de agua contribuye con una cantidad muy pequeña al aporte de aluminio a través de la dieta, la cual, en promedio, alcanza 10 mg Al/día.

Otra fuente de exposición es el empleo cotidiano de vajilla, utensilios, recipientes y folios de aluminio. La mayoría de los alimentos, afortunadamente, no disuelve cantidades importantes del catión aunque el ataque químico a tales recipientes y envoltorios varía con las condiciones de pH, temperatura y presencia de otras sustancias. La biodisponibilidad del metal por el uso de recipientes de aluminio en la cocina no ha sido muy estudiada, aunque se sabe que tanto el calor suministrado durante la cocción, como la adición de jugos ácidos y soluciones salinas, aumentan considerablemente la movilización del metal de los elementos que lo contienen (Rodríguez Suárez *et al*, 1986; Nagy & Jobst, 1994).

EXPOSICIÓN IATROGÉNICA

La encefalopatía dialítica fue una de las primeras observaciones que hicieron sospechar el desarrollo de alteraciones neurológicas a causa de la exposición a aluminio (Alfrey *et al*, 1976). La prescripción, a pacientes hemodializados, de medicamentos conteniendo hidróxido de aluminio como complejante de fosfatos para controlar la hiperfosfatemia (Wills & Savory, 1983; de Broe *et al*, 1988; Sanai *et al*, 1991; Salusky *et al*, 1991), acrecentaba la acumulación del metal incorporado directamente en el torrente sanguíneo a raíz de su presencia como contaminante del líquido de diálisis. A pesar de que la neurotoxicidad causada por aluminio ha virtualmente desaparecido en la población en diálisis, por el tratamiento previo del agua (Alfrey, 1994), aún se reportan efectos tóxicos causados por contaminación del agua o de las cañerías con el metal (Berend *et al*, 2001).

Otros pacientes que también están expuestos a aluminio son los bebés nacidos en pretérmino e individuos con quemaduras severas, los cuales se encuentran sometidos a nutrición parenteral, ya que el aluminio es un bien conocido contaminante de soluciones intravenosas (Nayak, 2002).

Las sales de aluminio son un constituyente habitual de productos cosméticos y antitranspirantes. Si bien la absorción del metal por la piel es muy baja, deben considerarse otras rutas –inhalación e ingestión– en las fórmulas en aerosol. En

particular, la ruta nasal-olfativa puede resultar muy significativa, ya que transportaría al aluminio directamente al cerebro, eludiendo las barreras hematoencefálica y renal (Flarend, 2001).

Debe llamarse la atención sobre una de las mayores fuentes de exposición a aluminio que, generalmente, pasa inadvertida por desconocimiento. Numerosos individuos están expuestos al metal por la ingestión regular de drogas sin prescripción, tales como antiácidos, aspirinas tamponadas o suplementos de calcio, la que puede aportar, diariamente, entre 10 y 100 mg de aluminio (Flarend, 2001).

EXPOSICIÓN OCUPACIONAL

Aunque periódicamente habían sido mencionados algunos efectos del aluminio perjudiciales para la salud, no se les prestó mayor atención hasta 1921, en que se publicó la primera descripción de efectos tóxicos en el hombre (Spofforth, 1921). Un trabajador de la industria metalúrgica manifestó severas alteraciones neurológicas adjudicadas a su exposición a aluminio debido a que se detectó una importante excreción urinaria del metal. Desde ese momento, se han documentado numerosos casos de alteraciones pulmonares, óseas y/o psicomotoras debidas a la exposición crónica o accidental en la industria (Elinder *et al*, 1991; Altmann, 2001). Es de esperar una mayor exposición potencial a aluminio en ciertos grupos ocupacionales, como por ejemplo en mineros, trabajadores de refinerías de aluminio, fundiciones, imprentas, editoriales y de la industria metalúrgica (Nayak, 2002).

La combinación de la amplia disponibilidad del metal con sus propiedades mecánicas y eléctricas únicas, aseguran a la química del aluminio un futuro brillante y en constante expansión. Ello implica que se deberá considerar, también, una mayor exposición ambiental (Atwood & Yearwood, 2000).

DISTRIBUCIÓN DE ALUMINIO AL ORGANISMO

La incorporación de aluminio al organismo por vía oral parecería ser muy lenta. La efectividad del intestino para actuar como una barrera protectora es ilustrada por el hecho de que sólo 1% de la dosis oral de aluminio es incorporada al organismo. Sin embargo, existen varios quelantes de aluminio, componentes orgánicos habituales de la dieta, que aumentan considerablemente la velocidad de absorción del metal (Wilhelm *et al*, 1990; Drüeke *et al*, 1997).

La vía inhalatoria tiene especial importancia en la exposición a compuestos de

aluminio en forma de polvos o aerosoles, especialmente en trabajadores que se encuentran en contacto con el metal. Se ha sugerido que el aluminio inhalado alcanza el cerebro a través del sistema olfativo o se distribuye en forma sistémica a través del epitelio pulmonar. Además, cuando se ingieren partículas se acumula en el organismo por vía gastrointestinal (Nayak, 2002).

Aún no se conocen por completo la interacción de los epitelios gastrointestinal, olfativo, pulmonar y dérmico con el aluminio. No obstante, estas barreras son ampliamente superadas por las administraciones intramuscular, intravenosa y parenteral.

Como ya se ha descrito, la mayor parte del aluminio absorbido circula en la sangre unido a proteínas y formando complejos orgánicos. La fracción que filtra libremente a través del glomérulo es aquella que corresponde al aluminio libre y al unido a aniones orgánicos (Wilhelm *et al*, 1989).

El aluminio no absorbido a nivel intestinal es excretado en las heces. Una fracción del total presente en los alimentos es retenida en células de la mucosa intestinal y eliminada por el proceso de descamación (Garnot, 1986). La excreción biliar constituye otra vía de eliminación (Wilhelm *et al*, 1990).

El riesgo de acumulación orgánica de aluminio y, en consecuencia, el de intoxicación por el metal, depende del balance entre la cantidad de aluminio absorbida en el tracto digestivo y la excretada por orina, bilis y materia fecal. Frente a una alteración del delicado equilibrio entre absorción y excreción, bien sea por incremento de la primera o por reducción de la última, el catión comienza a acumularse en los tejidos. tal como ocurre en personas de edad avanzada en pacientes con insuficiencia renal. Las poblaciones de mayor riesgo, en ese sentido, están constituidas por personas de edad avanzada cuya funciones fisiológicas sufren un deterioro gradual, niños recién nacidos cuyos órganos todavía no han completado su maduración y pacientes con función renal disminuida.

Así, la acumulación de aluminio en el organismo puede ser significativa por contacto con dosis elevadas por períodos cortos, o bien, por exposición crónica con dosis moderadas o bajas.

CAMBIOS PATOFISIOLÓGICOS INDUCIDOS POR ALUMINIO

Debido a la abundancia natural del Al y a su creciente utilización en la industria y en la vida moderna, es prácticamente improbable no encontrar trazas de este metal en

alguna célula de un ser vivo. La acción específica del tóxico determinará la magnitud y características del daño tisular, así como la manifestación de la alteración de alguna capacidad funcional del organismo (Silbergeld & Davis, 1994).

Actualmente, se considera que el cerebro constituye un sitio importante de acumulación de Al, independientemente de la vía por la cual el mismo ingresa al organismo.

En los pacientes en estadio terminal de enfermedad renal, tanto la ingestión de compuestos de aluminio prescritos para contrarrestar la hiperfosfatemia, como la contaminación con el metal durante el proceso hemodialítico, fueron asociadas con alteraciones de la conducta y signos de neuropatía (Wills & Savory, 1983). A pesar del tratamiento de los líquidos de diálisis por ósmosis reversa para disminuir la concentración de aluminio, numerosos pacientes en hemodiálisis todavía manifiestan síntomas de "demencia aluminica" (Di Paolo *et al*, 1997; Montenegro *et al*, 1998; Berend *et al*, 2001).

Sin embargo la exposición a aluminio es más amplia de lo que podría sospecharse. Por lo tanto, actualmente se reconoce que el riesgo de toxicidad por este metal no esencial no está limitado a los pacientes con insuficiencia renal, sino que abarca a otros pacientes con función renal normal, y aún a individuos sanos.

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales junto con la presencia de depósitos de aluminio en el sistema nervioso de pacientes con enfermedad de Alzheimer, han sugerido una posible conexión entre la neurotoxicidad producida por aluminio y la patogénesis de la enfermedad. Aunque esta relación todavía es motivo de controversia, no se puede ignorar la participación de la acumulación aluminica en el desarrollo de severas manifestaciones neurológicas, por lo que cada día adquiere mayor importancia la investigación de los mecanismos de toxicidad por aluminio en relación con enfermedades neurodegenerativas (Lukiw *et al*, 1992; Exley, 2001).

Entre los múltiples posibles mecanismos descritos para explicar la acción neurotóxica del aluminio, se ha sugerido la inducción de procesos oxidativos (Oria *et al*, 1995), ya que el metal, que no tiene capacidad redox, posee sin embargo, la habilidad de promover las propiedades pro-oxidantes del hierro y otros metales (Xie & Yokel, 1996, Bondy *et al*, 1998). Los radicales libres generados serían los causantes de alteraciones observadas en células de neuroblastoma (Smith *et al*, 1997; Campbell *et al*, 1999; Olivieri *et al*, 2000). Los procesos oxidantes podrían ser inducidos por una doble acción del aluminio, actuando sobre la organización de la membrana e interfiriendo en el metabolismo intracelular de hierro. Hasta ahora, no ha podido unificarse un mecanismo, entre muchos posibles, que pueda explicar la multiplicidad

de efectos, causados por aluminio y demostrados sobre distintos procesos celulares, pero es aceptada una acción tóxica del metal sobre el sistema nervioso.

Además de las neurológicas, otras manifestaciones clínicas están relacionadas con la exposición a aluminio. Numerosas experiencias clínicas y experimentales han demostrado la manifestación de enfermedades óseas en individuos que han recibido sobrecarga de aluminio. La osteomalacia, el dolor de hueso, las fracturas patológicas y la falta de respuesta a la terapia con vitamina D3 constituyen las características más comunes de la toxicidad inducida por aluminio en el tejido óseo (Nayak, 2002).

Los efectos del aluminio sobre el sistema respiratorio son frecuentes luego de la exposición por inhalación y los más expuestos son los trabajadores de la industria del aluminio, los que manifiestan asma, tos, fibrosis pulmonar o disminución generalizada de la función pulmonar.

ALUMINIO Y ANEMIA

La relación entre la acumulación de aluminio en determinado órgano y su toxicidad es compleja. En un principio, el aluminio fue sospechado como agente agravante de la anemia de la enfermedad renal al observarse una intensificación de la anemia normocítica preexistente pero con reservas normales de hierro (Wills & Savory, 1983; Eschbach & Adamson, 1985; Eschbach, 1989). El tratamiento de pacientes “aluminizados” con el agente quelante de aluminio desferrioxamina condujo a un significativo aumento de la concentración de hemoglobina, por lo que se adjudicó al aluminio el rol de un potente inhibidor de la síntesis de hemoglobina (Altmann *et al*, 1988).

La modificación de los parámetros hematológicos en los individuos expuestos a aluminio por la terapéutica dialítica, sin embargo, sólo constituyó una evidencia indirecta de la toxicidad adjudicada al metal, debido a la multiplicidad de factores que afectan la eritropoyesis en enfermos renales. La asociación entre aluminio y anemia pudo ser establecida más claramente en ensayos experimentales. No sólo se estudiaron ratas urémicas (Kaiser *et al*, 1984; Drüeke *et al*, 1986a; Nesse *et al*, 1997), sino, también, animales con función renal intacta con diversa exposición al metal.

Se demostró, así, que la exposición crónica al catión constituye un riesgo de intoxicación incluso en ausencia de disfunción renal. La anemia fue inducida mediante distintos diseños experimentales que incluían la administración de compuestos de aluminio a través de diversas rutas (Kaiser *et al*, 1984; Drüeke *et al*, 1986a; Garbossa *et al*, 1996 y 1998a).

Varios mecanismos han sido postulados como responsables de la inducción de anemia por exposición a aluminio. Hasta el presente no se han presentado evidencias de alteración en la producción de cadenas de globina, pero sí existe bibliografía sobre posible bloqueo de la síntesis de hemo, ya fuera afectando la biosíntesis de protoporfirina o interfiriendo en el metabolismo del hierro. Los resultados de estudios para demostrar el efecto que la presencia del metal ejercería sobre enzimas involucradas en el metabolismo del hemo parecería indicar inhibición de algunas, estimulación de otras, pero resultan, en conjunto, poco concluyentes o contradictorios (Buchet *et al*, 1987; Bia *et al*, 1989; Buys & Kushner, 1989). El análisis de los datos reportados en tal sentido parece indicar que es improbable que la inhibición de alguna de estas enzimas sea responsable de la anemia desarrollada como consecuencia de la exposición a aluminio.

Las similitudes químicas entre Fe^{3+} y Al^{3+} sugieren que ambos elementos podrían producir efectos metabólicos similares. Se ha comprobado que el receptor para transferrina, localizado en la membrana celular, no distingue entre la proteína que transporta aluminio y la que lleva unido el ligando fisiológico hierro. A ese nivel, se establece una competencia para la incorporación de ambos metales. Por ello, la célula sufre una adaptación aumentando la captación celular del metal esencial por vías no dependientes de transferrina (Pérez *et al*, 1999; 2001 y 2002).

Sobre la base de las experiencias realizadas con animales, se puede asumir que el aluminio es un factor exógeno responsable del desarrollo de signos de anemia. Además, parecería que la presencia del tóxico puede afectar diferentes estadios de las células en sus procesos de diferenciación y maduración eritroide. Sin embargo, falta información más concreta acerca de las características de la anemia desarrollada, de las alteraciones a que están expuestas las células con distintos grados de diferenciación, de los posibles mecanismos involucrados y de su interrelación para poder interpretar los efectos causados sobre el sistema eritropoyético como consecuencia de la exposición a aluminio.

OBJETIVOS

A pesar de que el aluminio es un metal ampliamente distribuido en la naturaleza, no se han hallado mecanismos fisiológicos en los que intervenga, por lo que, su presencia en el organismo puede resultar tóxica. La acumulación de aluminio en el organismo de pacientes y animales en estadios avanzados de insuficiencia renal ha sido asociada a anemia. Sin embargo una función renal intacta no resguarda del riesgo de intoxicación por aluminio.

OBJETIVO GENERAL

Si bien varios trabajos han abordado este tema y aportado datos acerca de los efectos que la exposición a aluminio parece causar sobre el sistema eritropoyético, se diseñó el presente estudio con el fin de describir en forma integral esos efectos y tratar de dilucidar mecanismos involucrados.

Para ello, se persiguieron los siguientes

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Primera Parte

Mediante un modelo experimental de intoxicación oral de ratas con función renal normal, se intentó responder las siguientes preguntas:

- § ¿La ingestión crónica de dosis moderadas de aluminio produce anemia?
- § De ser así, ¿cuáles son las características de la anemia desarrollada?
- § ¿Se pueden detectar cambios específicos en las células eritroides relacionados con la intoxicación con el metal?
- § ¿Afecta la intoxicación crónica con aluminio algún aspecto nutricional? En particular, se altera la incorporación de hierro al organismo?
- § ¿Ingresa el aluminio al organismo? Si es así, ¿cuáles son los órganos en los que se deposita el metal?

Segunda Parte

A partir de los resultados experimentales, desarrollados en la primera parte de este trabajo, se postularon hipótesis acerca de posibles mecanismos de acción por los

cuales el aluminio podría haber afectado células eritroides en distintos estadios de maduración.

Se emplearon modelos experimentales de células eritroides de origen humano, progenitoras de médula ósea, eritrocitos maduros y líneas celulares, para tratar de responder los siguientes interrogantes:

- § ¿Ejerce el aluminio una acción directa sobre las células maduras circulantes?
- § ¿Los cambios morfológicos observados en los eritrocitos pueden deberse a una acción del aluminio sobre componentes de la membrana celular?
- § ¿El efecto inhibitorio de la respuesta de células progenitoras eritroides a la eritropoyetina es consecuencia de una acción del metal sobre la actividad de la hormona?
- § En caso afirmativo, ¿puede el aluminio modificar la cascada de señalización intracelular desencadenada por eritropoyetina?

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO I

EFFECTO POR EXPOSICIÓN CRÓNICA

A ALUMINIO IN VIVO

I. ANIMALES

Se emplearon ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 21 días de edad con peso comprendido entre 93 y 109 g. Los animales fueron alojados en jaulas mantenidas en ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz de 12 h. Se proporcionó alimento balanceado *ad libitum*.

Las ratas fueron distribuidas al azar en dos grupos: animales controles (C, n=8) y animales tratados con solución de aluminio (Al, n=10). El período experimental fue de 8 meses.

I.a. Sobrecarga oral con soluciones de aluminio

El grupo de ratas tratadas recibió solución de citrato de Al 80 mM y el grupo de ratas control, agua de red como bebida diaria. La solución de citrato de Al fue preparada con cantidades equimolares de cloruro de Al y citrato de sodio, utilizando agua deionizada.

I.b. Reactivos y materiales

Las drogas empleadas en la preparación de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Se empleó agua ultrapura con resistividad específica de 18 M Ω (Milli-Q Water System, Millipore, USA) para lavado del material y para la preparación de los reactivos y medios de cultivo.

El material utilizado en las experiencias fue lavado para eliminar la contaminación con trazas de Al, según el siguiente esquema de trabajo:

El material de vidrio limpio se sumerge durante 24 h y el de plástico, 2 h en HCl 30% (v/v). Luego, se realizan 10 enjuagues con agua destilada, proceso utilizado para eliminar la mayor cantidad de ácido de las paredes internas. Los restantes enjuagues se efectúan con agua ultrapura (Moody & Lindstrom, 1977). Se considera que los recipientes están totalmente libres de ácido cuando el pH del agua de lavado es igual

al pH del agua ultrapura del suministro. Esto, generalmente, se consigue luego del decimoquinto enjuague.

I.c. Obtención y procesamiento de muestras

Las extracciones sanguíneas y procedimientos quirúrgicos en los animales fueron realizados bajo los efectos de vapores de éter etílico como anestésico.

Las extracciones de las distintas muestras fueron efectuadas por punción cardíaca con aguja 21 G1". Con jeringa heparinizada se sangró el animal "a blanco". Se prepararon frotis de sangre periférica con muestra de punta de jeringa.

Se apartó una alícuota (1,5 ml) de la muestra para efectuar las determinaciones de hemoglobinemia, volumen globular, prueba de reducción de metahemoglobina, recuento de reticulocitos y estudio morfológico de glóbulos rojos.

El resto de la muestra fue centrifugada a 500 g durante 10 min a 4°C. Se separó el plasma que fue congelado a -20°C para ser utilizado en las determinaciones de los niveles de hemoglobina, haptoglobina, urea, ferremia, capacidad total de fijación de hierro y aluminio.

Después del sangrado "a blanco", los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Cada animal fue rociado con etanol 70°. A través de una amplia incisión practicada en el muslo, se extrajo el fémur. Luego de despojarlo de la mayor cantidad posible de músculo con una hoja de bisturí y gasa, bajo condiciones de esterilidad, el hueso fue inmediatamente colocado en una caja de Petri conteniendo medio de cultivo y mantenido en hielo hasta su procesamiento para la obtención de médula ósea (m.o.). El fémur contralateral, bazo, hígado, cerebro y riñón de cada animal, fueron removidos, lavados profusamente con solución fisiológica estéril y conservados a -20°C hasta el análisis del contenido de Al.

I.d. Evaluación de la función renal

Se efectuó a través de la determinación de la concentración plasmática de urea. Se empleó el equipo Urea UV (Wiener Lab) que se basa en la reacción enzimática con ureasa y posterior cuantificación del amoníaco liberado, mediante reacción secundaria en la que se determina el consumo de NADH a 340 nm.

II. DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS

II.a. Hemoglobinemia

La concentración de hemoglobina en las muestras de sangre se determinó por el

método de Drabkin (Dacie & Lewis, 1995). La medición espectrofotométrica de la absorbancia de la cianometahemoglobina, formada tras efectuar una dilución 1:250 de sangre en reactivo de Drabkin (cianuro de potasio 0,77 mM; ferricianuro de potasio 0,61 mM, en bicarbonato de sodio 11,9 mM), fue realizada a 540 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración de hemoglobina estándar Hemoglownier (Wiener Lab) que cubría el rango de 49.6 a 298 g/l. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado.

II.b. Volumen globular

El hematocrito se midió empleando un micrométodo. Capilares heparinizados cargados con la muestra de sangre fueron centrifugados a 10000 *g* durante 5 min (Routine RM 24). El volumen globular se determinó por lectura en ábaco circular. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

II.c. Frotis de sangre periférica

La morfología eritrocitaria se observó en los extendidos, realizados por duplicado, de la sangre periférica de cada animal, coloreados con la tinción de May Grünwald-Giemsa. Se fijó el preparado con 30 gotas de solución colorante de May Grünwald (eosinato de azul de metileno 3 g/l en metanol) durante 1 min. Se agregaron 30 gotas de *buffer* fosfato 1,7 mM, pH 7,0 durante 1 min. Se cubrió el frotis durante 10 min con solución colorante según Giemsa diluido (1 gota de colorante por cada ml de *buffer* fosfato pH 7,0) y se lavó con el mismo *buffer*.

Se realizó la observación microscópica sobre el tercio final del extendido con magnificación de 1000x.

II.d. Recuento de reticulocitos

Se empleó el colorante supravital azul brillante de cresilo que pone de manifiesto la presencia de restos de ribonucleoproteínas en el citoplasma de los reticulocitos, en los cuales se observa una trama granular o filamentosa de color azul.

Se agregaron 3 gotas de la solución colorante (azul brillante de cresilo 10 g/l en citrato trisódico 20,4 mM, cloruro de sodio 116 mM) a 0,3 ml de sangre, incubándose a 37°C durante 20 min. Al cabo de ese tiempo se prepararon los extendidos por triplicado, los cuales fueron teñidos con May Grünwald-Giemsa, según la metodología descrita, para mejorar el contraste (Dacie & Lewis, 1995). El recuento fue realizado microscópicamente con magnificación 1000x empleando una cuadrícula de, aproximadamente, 4 mm de lado. Fue determinado el porcentaje de reticulocitos en una población de 1000 células.

III. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La observación morfológica de las células fue realizada en un microscopio electrónico de barrido (Phillips 515), mediante el cual se analizaron imágenes tridimensionales de la superficie celular con una elevada resolución.

La variación en la composición de cationes intracelulares fue detectada por medición de la energía dispersada de rayos-X (EDAX 910), técnica que permite obtener un mapa cuantitativo de la composición de elementos. Se empleó el equipo del Servicio de Microscopía Electrónica de CITEFA.

Tratamiento y observación de la muestra

Una gota de sangre anticoagulada fue depositada sobre un pequeño soporte de vidrio de 7 mm de lado. La muestra fue fijada con glutardialdehído 3% (v/v) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 20 min. A continuación se efectuaron tres lavados con *buffer* fosfato. Las soluciones de fijación y lavado fueron retiradas por absorción con papel de filtro. Finalmente, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación, sumergiéndolas sucesivamente en acetona 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100%, repitiendo tres veces cada operación. Para completar el secado de la muestra biológica se efectuó el punto crítico (Balzers CPD 030), proceso que, mediante variaciones de presión y temperatura, reemplaza la acetona por dióxido de carbono gaseoso. Como último tratamiento, la muestra fue cubierta con carbono y metalizada con oro-paladio (Balzers Union SCD 040). Este proceso de metalizado permite la interacción entre el haz de electrones del microscopio y la muestra, la cual emite señales que luego se traducen en pulsos eléctricos. Mientras se efectuaba la observación microscópica se tomaron fotografías de los campos representativos.

IV. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS INDICADORES DE HEMÓLISIS INTRAVASCULAR

IV.a. Haptoglobina

Para determinar la concentración plasmática de haptoglobina fue utilizada la técnica de inmunodifusión radial simple mediante el uso del reactivo de diagnóstico NOR-Partigen (Behringwerke). La difusión del plasma en una placa de agar que contiene incorporado un antisuero anti-haptoglobina produce un anillo de precipitación, siendo el cuadrado del diámetro proporcional a la concentración de la proteína correspondiente.

Se comprobó, en primer lugar, que el anticuerpo anti-proteína humana producía

reacción inmunológica positiva con la haptoglobina de rata.

Los datos observados con cada muestra fueron interpolados en la curva de calibración provista por el equipo, la cual fue controlada mediante el uso del *Standard Human Serum* (Behringwerke).

IV.b. Prueba para detectar deficiencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD)

Se empleó el método de Brewer y colaboradores (1962) con modificaciones introducidas para trabajar con pequeños volúmenes de muestra.

La prueba se basa en la reducción de la metahemoglobina formada a partir de la oxidación de la hemoglobina de la muestra por nitrito de sodio. En el eritrocito, por otra parte, la glucosa es transformada a glucosa-6-fosfato mediante la acción de G6PD, principal enzima del camino de las pentosas, generando NADPH. En presencia de azul de metileno y NADPH, un electrón es transferido al Fe^{3+} de la metahemoglobina, la cual es reducida a hemoglobina. En caso de deficiencia de G6PD, está bloqueado el camino de las pentosas y la metahemoglobina persiste porque no puede ser reducida en ausencia de NADPH.

Se emplearon nitrito de sodio 180 mM y glucosa 280 mM, como solución oxidante y azul de metileno 15 g/l como solución reductora. Se prepararon dos series de tubos para cada muestra: control (con solución oxidante) y prueba (con soluciones oxidante y reductora), contenido que fue secado a 37°C. A cada par de tubos se agregaron 0,2 ml de cada muestra de sangre, los cuales fueron incubados a 37°C durante 3 h. Finalmente, se efectuó una dilución 1:100 con agua destilada y, después de mezclar cuidadosamente, se compararon los colores entre las series.

IV.c. Hemoglobina en plasma

El ensayo se basó en la oxidación de bencidina por el oxígeno liberado del agua oxigenada por acción catalítica del grupo hemo de la hemoglobina, con la formación de un producto coloreado evaluado espectrofotométricamente.

La concentración de hemoglobina libre en plasma fue determinada, por duplicado, en 20 μl de plasma por agregado de 1 ml de bencidina 10 g/l en ácido acético 90% y de 1 ml de H_2O_2 11%. Después de incubar durante 20 min a temperatura ambiente, se agregaron 10 ml de ácido acético 10% y se efectuó la medición espectrofotométrica de la absorbancia a 515 nm. Los valores fueron interpolados en una curva de calibración obtenida con un estándar (Hemoglowiener) para un rango de hemoglobina entre 50 y 200 mg/l (Crosby & Furth, 1956).

V. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO

V.a. Tinción para siderocitos y sideroblastos

El ferrocianuro de potasio reacciona en medio ácido con el Fe^{3+} de los depósitos intracelulares para formar el complejo ferrocianuro férrico o azul de Prusia.

Los extendidos de sangre periférica y de m.o. fueron fijados durante 5 min con metanol. Luego del lavado con agua corriente fueron cubiertos con ferrocianuro de potasio 24 mM en HCl 0,1 N durante 10 min. Tras un lavado, fueron teñidos con safranina 0,1% como colorante de contraste durante 3 min, lavados y secados al aire. La observación se realizó en microscopio con magnificación de 1000x (Dacie & Lewis, 1995).

V.b. Ferremia

La concentración de hierro (Fe) plasmático fue determinada por un método colorimétrico empleando el reactivo de diagnóstico "Hierro sin desproteinización" (Boehringer Mannheim). El Fe se disocia de su unión con transferrina en medio ácido y, en presencia de un agente reductor, cambia su estado de oxidación a Fe^{+2} . Este reacciona con ferrozina formando un complejo magenta cuya absorbancia se determina espectrofotométricamente a 562 nm. El color desarrollado es proporcional a la concentración total de Fe, la cual fue calculada teniendo en cuenta la absorptividad molar del producto de color ($\epsilon=122 \text{ l.cm}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}$).

Los reactivos provistos por el equipo de diagnóstico fueron: *buffer* (acetato sódico 17 mM; pH 5,5), ácido ascórbico como agente reductor y ferrozina. Para control del método se utilizó un suero control Standatrol (Wiener Lab).

Con el objeto de comprobar si el Al interfiere en la reacción entre el Fe y la ferrozina se determinó el Fe plasmático con agregado de concentraciones crecientes de Al (0 - 200 $\mu\text{g/l}$). Al realizar el análisis estadístico (Prueba de Kruskal-Wallis), no se encontraron diferencias significativas de la concentración de Fe obtenida en presencia de las distintas concentraciones de Al. Con este resultado se demostró que el Al no interfiere en la unión del complejo que forman el Fe y la ferrozina.

V.c. Capacidad total de fijación de hierro

La capacidad total de fijación de Fe determina la masa de Fe que satura todos los sitios de unión disponibles en la molécula de transferrina y es representativa de la cantidad de transferrina plasmática. Los sitios de las moléculas de transferrina plasmática fueron saturados con solución estabilizada de Fe^{3+} . El remanente de Fe^{3+} no ligado se eliminó por coprecipitación con carbonato de magnesio (Fer-color Transferrina,

Wiener Lab). Tras una vigorosa agitación, se procedió a centrifugar 15 min a 7200 g. El Fe unido a transferrina se determinó espectrofotométricamente empleando la técnica descrita para ferremia.

V.d. Saturación de transferrina plasmática

Con los datos obtenidos de la concentración de Fe en plasma y capacidad total de fijación de Fe se calculó el porcentaje de saturación de transferrina plasmática.

VI. DESARROLLO DE CFU-E

VI.a. CFU-E: Unidad formadora de colonias eritroides

Una unidad formadora de colonias eritroides, CFU-E, es la célula progenitora de la serie roja que da origen a una colonia conformada por un grupo de 8 a 65 células, parcial o totalmente hemoglobinizadas (Stephenson *et al*, 1971; McLeod *et al*, 1974).

VI.b. Medios de cultivo

- Medio de cultivo básico: medio mínimo esencial de Eagle α -modificado, con sales de Earle sin ribósidos o deoxirribósidos (α -MEM). La adición de NaHCO_3 26 mM y *buffer* HEPES 25 mM permitió regular el pH entre 7,2-7,4.
- Medio de recolección: medio de cultivo básico adicionado con suero fetal bovino (SFB) 2% (McLeod *et al*, 1974).
- Medio semisólido: medio de cultivo básico adicionado con SFB 25%; L-glutamina 2 mM; 2-mercaptoetanol 0,1 mM; sulfato de gentamicina 50 mg/l y metilcelulosa 0,8% (p/v) (Iscove *et al*, 1974).

VI.c. Obtención de células de médula ósea

Se cortaron ambas epífisis del hueso mantenido en hielo desde su extracción. El contenido medular fue obtenido por perfusión con 1 ml de medio de recolección y el material, recogido en una caja de Petri colocada en hielo. La suspensión medular fue aspirada e impelida varias veces con pipeta tipo Pasteur para disgregar las células, fue lavada con 10 ml de medio de recolección a 4°C (McLeod *et al*, 1974) y centrifugada a 500 g durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento.

Las células fueron suspendidas en 2 ml de medio de recolección. Una alícuota de la suspensión fue diluida convenientemente con solución de ácido acético 3% (v/v) coloreado con azul de metileno para determinar el recuento celular en cámara de

Neubauer.

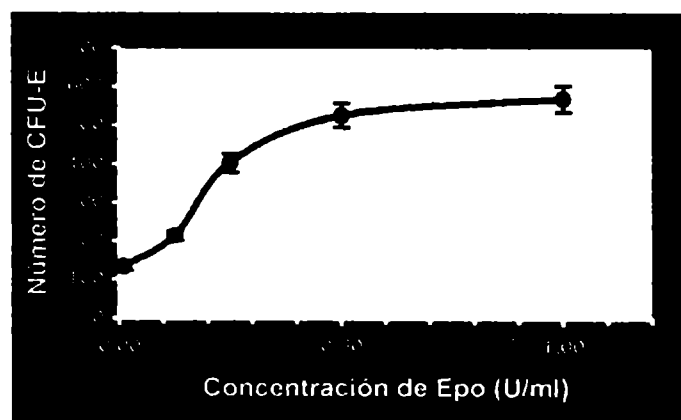
VI.d. Cultivo de CFU-E

Las células de m.o. fueron suspendidas en medio semisólido en concentración final de 2×10^5 cél./ml y estimuladas con eritropoyetina (Epo) (como se describe en *VI.e.*). Un mililitro de esta suspensión celular fue distribuida en placas de Petri de poliestireno (10x35 mm). Cada ensayo fue realizado por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera saturada con vapor de agua y en presencia de 5% de CO₂ durante 48 h, al cabo de las cuales fueron coloreadas según la técnica descrita por Ogawa *et al* (1976). La tinción citoquímica pone de manifiesto la actividad pseudoperoxidásica de las células eritroides cuando se las incuba con H₂O₂ en presencia de un sustrato cromogénico. Para ello, se utilizó una solución recién preparada de 3-3' diaminobencidina 0,03% en Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 y H₂O₂ 0,5%. Las células parcial o totalmente hemoglobinizadas tomaron una coloración cuya gama varió del naranja al marrón oscuro. Las colonias eritroides fueron visualizadas en un microscopio invertido con aumento de 100x y su recuento se efectuó en un área de 41 mm² utilizando un retículo micrométrico ocular de 0,27 mm² de superficie.

El número de CFU-E en cada ensayo se expresa como la media geométrica ($G \pm S_G$) de triplicados. Esta forma de expresión de los resultados es la apropiada para el tipo de crecimiento exponencial de las CFU-E.

VI.e. Curva de calibración dosis-respuesta con eritropoyetina

Para determinar la concentración óptima de Epo necesaria para estimular el desarrollo de CFU-E, se realizó una curva dosis respuesta en la que 2×10^5 células de m.o. fueron estimuladas con 0,125; 0,25; 0,50 y 1,00 unidades de rHuEpo (Hemax, BioSidus SA, Argentina) por mililitro (U Epo/ml). El del desarrollo de colonias eritroides ($G \pm S_G$) correspondientes a un ensayo realizado por triplicado se observan en la Figura:



Efecto de la concentración de Epo sobre el desarrollo de colonias eritroides

En los cultivos controles no estimulados con Epo ($x=0$), se observó el crecimiento de colonias eritroides que corresponderían al desarrollo y diferenciación de las células más maduras de la progenie eritroide de la rata, estimuladas *in vivo* por la hormona circulante endógena. La proteína recombinante empleada permitió el desarrollo de un importante número de colonias con el agregado de 0,125 U Epo/ml y a partir de 0,5 U Epo/ml quedó establecido un *plateau*. Para los sucesivos cultivos la concentración de Epo elegida fue 0,25 U/ml.

VII. DESTRUCCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y DETERMINACIÓN DE ALUMINIO

Las muestras de tejido fueron digeridas en un horno de microondas programable (CEM Microwave Digestion System, MDS 2000. Mattheus, NC, USA). Se realizó la destrucción de la materia orgánica en medio ácido en un recipiente cerrado empleando calentamiento asistido por microondas (frecuencia 2450 MHz) bajo presión controlada, para la posterior determinación de Al por espectrometría de absorción atómica.

Un fémur, bazo, cerebro, hígado y riñón de cada uno de los animales fueron descongelados y secados en estufa a 60°C durante 48 h.

Las muestras, previamente pesadas (140-800 mg), fueron introducidas en recipientes de teflón a los que se agregó HNO₃ 65% (v/v). El sensor de presión se colocó en el recipiente que contenía la muestra de mayor peso. Se desarrolló el programa de digestión adecuado para cada uno de los órganos de acuerdo con los parámetros indicados en la Tabla 1. Finalizada la digestión, los recipientes fueron enfriados. Se permitió, bajo campana, la salida de los gases de NO y NO₂ generados.

Las soluciones fueron transferidas cuantitativamente a matraces aforados (hueso: 100 ml y bazo, hígado, cerebro y riñón: 50 ml).

La cuantificación de Al se efectuó en espectrómetro de absorción atómica (Shimadzu AA-6501, Japón) acoplado a un horno de grafito (Shimadzu GF 6000). Se empleó nitrato de magnesio, adicionado automáticamente, como modificador de matriz para evitar la pérdida de compuestos volátiles de Al durante las etapas de desarrollo de altas temperaturas. Cada muestra fue analizada, por lo menos, por sextuplicado, hasta alcanzar un coeficiente de variación < 5%. La curva de calibración fue construida en base a la altura de los picos de las señales correspondientes a las soluciones testigos con concentración conocida. La concentración de Al fue determinada por el Dr Jorge Stripeikis en el Laboratorio de Análisis de Trazas del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física de la F.C.E. y N.

Tabla 1: Condiciones experimentales para la destrucción de la materia orgánica tisular

Hueso			
	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Reactivo	HNO ₃	HNO ₃	HNO ₃
Volumen (ml)	10	10	10
Potencia (watts)	490	490	490
Presión (PSI)	50	100	150
Tiempo (min)	8	10	10

Hígado					
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Reactivo	HNO ₃	HNO ₃	HNO ₃	HNO ₃	HNO ₃
Volumen (ml)	10	10	10	10	10
Potencia (watts)	260	260	260	260	260
Presión (PSI)	25	50	75	100	150
Tiempo (min)	5	5	5	5	5

Razo Ríñon Cerebro			
	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Reactivo	HNO ₃	HNO ₃	HNO ₃
Volumen (ml)	10	10	10
Potencia (watts)	490	490	490
Presión (PSI)	50	100	150
Tiempo (min)	5	5	5

CAPÍTULO II

ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE CÉLULAS ERITROIDES MADURAS

I. INCUBACIÓN DE ERITROCITOS *IN VITRO*

Eritrocitos de sujetos adultos sanos, hombres y mujeres, con edades comprendidas entre 29 y 35 años, fueron sometidos a un proceso de envejecimiento *in vitro* en presencia de compuestos de Al con el fin de estudiar una acción directa del metal.

Muestras de sangre periférica, fueron extraídas por punción venosa con heparina como anticoagulante. Las células mononucleares, el plasma y las plaquetas fueron cuidadosamente descartados luego de centrifugar la sangre a 500 g durante 10 min a 4°C. La fracción de eritrocitos fue lavada 3 veces en 10 volúmenes de *buffer* fosfato salino (PBS; NaCl 0,137 M; KCl 3 mM; NaH₂PO₄ 1,9 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4) empleando las mismas condiciones de centrifugación. Para asegurar la total remoción de leucocitos y plaquetas, la porción superior de la columna de eritrocitos de, aproximadamente, 3 ó 4 mm de altura, fue también descartada.

El paquete globular fue suspendido en medio 199 (Sigma Chemical Co) conteniendo L-glutamina 2 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml e incubado a 4°C (Kay, 1975) durante diferentes períodos. El medio de incubación fue renovado cada 3 ó 4 días.

Como control de envejecimiento se emplearon eritrocitos procesados en el momento de la extracción.

II. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y PROPIEDADES DE LOS ERITROCITOS

II.a. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los cambios morfológicos de los eritrocitos fueron estudiados por MEB empleando la metodología (preparación de muestra y observación microscópica) detallada en el Capítulo I sección III.

II.b. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con el fin de obtener mayor información acerca de las características estructurales de los glóbulos rojos sometidos a distintas condiciones experimentales se utilizó la técnica de MET.

La suspensión de eritrocitos fue fijada con glutaraldehído 1% (v/v) en PBS por 30 min a temperatura ambiente y postfijada con OsO₄ 1% en NaCl 0,9% (p/v) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra fue deshidratada con baños en sucesivas soluciones de acetona entre 50 y 100%.

Una vez deshidratada, la muestra fue incluida embebiéndola en resina Epon. Se realizaron numerosos cortes de cada muestra con un ultramicrotomo, los que fueron depositados en las grillas respectivas. Las secciones fueron teñidas con nitrato de plomo 9% (p/v) y luego, con acetato de uranilo 2% (p/v).

Las grillas fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL-1200 EXII) perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica, INTA Castelar.

II.c. Fragilidad osmótica

Una alícuota de una suspensión de eritrocitos (1:50 con PBS) fue agregada a 13 soluciones de NaCl en H₂O destilada en proporción 1:200. El rango de concentraciones de las soluciones hemolizantes fue de 17,0 a 145,3 mM. Finalizado el periodo de incubación de 30 min a temperatura ambiente, el contenido de los tubos fue homogenizado. Por centrifugación a 500 g por 5 min sedimentaron los eritrocitos intactos. La lisis celular fue determinada por lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 540 nm. Se adjudicó el valor de 100% de hemólisis a la absorbancia medida en un tubo que contenía la muestra diluida con H₂O destilada (hemólisis máxima). Se graficaron los valores de porcentaje de hemólisis en función de la concentración salina de las soluciones hemolizantes y se obtuvieron los valores de fragilidad corpuscular media (FCM), que es la concentración de la solución salina a la que se produce 50% de hemólisis.

II.d. Viscosidad de la membrana

Para estudiar la viscosidad de la superficie de la membrana eritrocitaria se utilizó un viscosímetro rotacional (Wells-Brookfield LVT-CP) a diferentes velocidades de corte (230, 115, 46 s⁻¹) (Bazzoni & Rasia, 2001).

Una alícuota de eritrocitos (4 a 8x10⁷ cél./ml) diluida en una solución de polivinilpirrolidona altamente viscosa (viscosidad 20 cp; 290 mOsm; pH 7,4) fueron sometidos a 4 fuerzas que actúan en un plano (*shear stress*) (1,74x10⁻³ dinas/cm²) para obtener una máxima deformación. El haz de un láser que atraviesa la suspensión

produce un patrón de difracción de deformabilidad eritrocitaria, que fue analizado por fotometría. Se midieron la constante de tiempo (t_r) que es el tiempo característico que se tarda en recobrar la forma luego de una interrupción abrupta de la fuerza inicial, y el módulo elástico de la membrana (μ), medida de la magnitud de la fuerza necesaria para inducir una deformación uniaxial con un área constante. Con estos dos parámetros se evaluó la viscosidad de la superficie de membrana (η) que se calcula como el producto entre t_r y μ .

El análisis de viscosidad de las membranas eritrocitarias fue realizado en la Cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario.

III. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO

III.a. Preparación de membranas eritrocitarias

Las membranas de glóbulos rojos (*ghosts* o “fantasmas”) fueron obtenidas por el método de Rouyer-Fessard y colaboradores (1987). Los eritrocitos fueron lisados con *buffer* fosfato de sodio 5 mM, pH 8 a 4°C, conteniendo inhibidores de proteasas (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 50 μ M e inhibidor de tripsina (*soya bean trypsin inhibitor*, SBTI) 50 mg/l) en proporción 1:13 entre el paquete globular y el *buffer*. Luego de 15 min de incubación en hielo se centrifugó a 13000 *g* durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citosólica, fue separado. Las membranas fueron lavadas con igual volumen de *buffer* y centrifugadas bajo las mismas condiciones hasta que el sobrenadante se hallara libre de hemoglobina (5 ó 6 lavados).

Las membranas eritrocitarias fueron conservadas a -20°C.

III.b. SDS-PAGE de proteínas de membrana

Se determinó la concentración de proteínas de membrana por el método de Lowry y colaboradores (1951) tras efectuar una dilución 1:40 en SDS 1% (p/v) para favorecer la disolución.

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de los fantasmas eritrocitarios, empleando el sistema discontinuo de Laemmli (1970). Para ello se usó una cuba electroforética (Miniprotean II, Bio-Rad) y una fuente de poder (EPS 600, Pharmacia). En SDS-PAGE, la diferencia de movilidad electroforética de las proteínas se basa en diferencias entre sus tamaños moleculares, dado que el tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las mismas.

La concentración de monómero (T) en el gel concentrador fue de 4%: acrilamida 39 g/l; bisacrilamida 1 g/l; SDS 1 g/l en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED $\delta=0,77\pm0,02$ g/l) 0,3 ml/l y persulfato de amonio 0,37 g/l como iniciador.

El T en el gel separador fue de 8%: acrilamida 78g/l; bisacrilamida 2,1 g/l; SDS 1 g/l; TEMED 0,3 ml/l; persulfato de amonio 0,37 g/l en Tris-HCl 375 mM, pH 8,8.

Las membranas fueron solubilizadas en el *buffer* de muestra (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8; conteniendo SDS 2% (p/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,01 g/l) por calentamiento a ebullición durante 1 min. Una masa de 5 μ g de proteínas fue sembrada en cada calle y en cada placa fue incluido un marcador de pesos moleculares preteñido.

La electroforesis fue desarrollada a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y 25 mA en el gel separador.

Al finalizar la electroforesis, el gel fue coloreado utilizando la doble tinción de reactivo de plata y colorante azul brillante de Coomassie R-250 (ABC), de acuerdo a Dzandu y colaboradores (1984). Esta tinción permite diferenciar los componentes de la membrana (proteínas, sialoglicoproteínas y lípidos) en un único gel. En primer lugar, el gel fue coloreado con los reactivos para tinción con plata (Bio-Rad), siguiendo el protocolo provisto por el comerciante y teniendo la precaución de utilizar recipientes de vidrio y manipular el gel con guantes para no alterar la reacción con plata. Posteriormente, el gel fue contra-coloreado 30 min con ABC 0,2% en solución decolorante (metanol : ácido acético : agua destilada, 3:1:6 v/v/v) y decolorado.

Otro gel, desarrollado en paralelo fue utilizado en la técnica de *immunoblotting*.

III.c. Electrotransferencia e immunoblotting

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo la metodología descrita por Towbin y colaboradores (1979), en un equipo Hoefer TE 22 Mini Tank Transphor Unit (Amersham Pharmacia Biotech) a 120 mA y 30 V durante 90 min. Durante todo el proceso se emplearon guantes para evitar contaminar las NC con proteínas externas.

Previo a la transferencia, las NC y los geles fueron hidratados 30 min en el *buffer* de transferencia (Tris 25 mM; glicina 195 mM; SDS 0,05%, pH 8,3; metanol 20% (v/v)).

Al finalizar la transferencia, las NC fueron lavadas varias veces con *buffer* TBS (Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM; pH 7,4). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con albúmina sérica bovina (BSA) 2% (p/v) en TBS durante la noche. Luego, las NC fueron incubadas durante 1h con agitación constante con un

anticuerpo monoclonal contra la proteína humana banda 3 (Sigma Chemical Co) o espectrina humana (Sigma Chemical Co) diluidos 1:5000 y 1:500, respectivamente, con BSA 1% (p/v) en TBS.

Luego de dos lavados con Tween 20 0,05% en TBS (15 min) y uno con TBS (15 min) se procedió a incubar las NC, durante 1 h con agitación, con anticuerpo de conejo contra IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co), diluido 1:10000 con BSA 1% en TBS. Las proteínas no unidas fueron removidas mediante un procedimiento de lavado igual al anteriormente explicado. Las bandas fueron reveladas empleando el reactivo comercial Sigma Fast (sustrato para fosfatasa alcalina 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y reactivo *nitro blue tetrazolium*, Sigma Chemical Co). Una vez obtenida la señal, la reacción fue detenida con agua destilada.

IV. CONTENIDO DE ALUMINIO EN LAS FRACCIONES CELULARES

Se determinó el contenido de Al en la membrana y en la fracción citosólica de los eritrocitos. Para obtener ambas fracciones se procedió a la lisis celular y centrifugación (como se detalló en el Capítulo II, sección *III.a*). Un mililitro de la fracción citosólica se conservó a -20°C . Las membranas fueron lavadas y, una vez removida la hemoglobina, los fantasmas fueron disueltos en SDS 1% y conservados a -20°C .

La cuantificación del contenido de Al en ambas fracciones se efectuó mediante espectrometría de absorción atómica (como se detalló en el capítulo I, sección VII).

CAPÍTULO III

MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR A ERITROPOYETINA POR ACCIÓN DE ALUMINIO

I. MANTENIMIENTO Y PRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS

Durante esta etapa de la investigación fueron utilizados cultivos primarios de células progenitoras eritroides humanas y dos líneas celulares como modelos experimentales.

I.a. Criopreservación

I.a.1. Congelamiento

Para preservar las células por un período prolongado se requieren temperaturas extremadamente bajas. Estas temperaturas hacen que el metabolismo celular disminuya significativamente. El principal problema que presenta el congelamiento celular es la formación de cristales en el citoplasma que tienden a romper la membrana celular. Para evitar esto, se han utilizado una gran cantidad de agentes químicos -glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), polivinilpirrolidona- que hacen que la temperatura intracelular descienda de manera gradual.

La suspensión celular a ser congelada (10^6 - 10^7 cél./ml) fue centrifugada a 200 g durante 10 min. La mezcla congelante (medio de cultivo: SFB: DMSO; 45:45:10; v/v/v) fue agregada al *pellet*. La suspensión celular fue rápidamente homogeneizada y trasvasada a un criotubo que fue colocado en un contenedor para frisar "Mr Frosty" (Nalgene). Este recipiente colocado a -20°C y luego a -70°C permite que la temperatura disminuya aproximadamente 1 - 2°C por min. Cuando el sistema alcanzó dicha temperatura, los criotubos fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido a -174°C (Hay, 1992).

I.a.2. Descongelamiento

Para la reconstitución de las células, el criotubo fue rápidamente sumergido en un baño a 37°C . Una vez descongelada, la suspensión fue trasvasada a un tubo de centrifuga al que se agregó la mezcla apropiada de medio de cultivo, SFB y antibióticos según el tipo celular, como se detalla en el Capítulo III, secciones *II.a*, *III.a* y *III.b*. Este procedimiento debe efectuarse en forma muy lenta y con intervalos de 1 - 2 min/ml.

Por último, después de centrifugar 10 min a 200 *g*, se removió el sobrenadante y se agregó medio fresco (Hay, 1992).

I.b. Viabilidad y recuento celular

La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión de colorante supravital, en una dilución de la suspensión celular 1:2 con azul Tripán 2 g/l en PBS. El recuento de células en esta suspensión fue realizado en microscopio óptico con aumento de 400x, utilizando una cámara de Neubauer modificada (McAteer & Davis, 1994).

II. CÉLULAS PROGENITORAS ERITROIDES HUMANAS

Células progenitoras eritroides humanas fueron semipurificadas a partir de sangre periférica de voluntarios sanos, previo consentimiento de los mismos. Se recolectaron células hematopoyéticas pluripotentes de sangre periférica a través de máquina de aféresis, con una programación específica para dicho objetivo (Servicio de Hemoterapia del Hospital Naval, Ciudad de Buenos Aires).

II.a. Purificación de células progenitoras

Los concentrados celulares de sangre periférica fueron lavados 3 veces mediante centrifugación a 200 *g* durante 10 min a 8°C con medio de lavado α -MEM - SFB 2%. Posteriormente, las células fueron semi-purificadas mediante un gradiente de centrifugación diferencial con Ficoll-Paque Plus 1,077 g/ml (F-P) (Amersham Pharmacia Biotech) en relación F-P: α -MEM, 3:2, empleando 1 ml por cada $1,5 \times 10^7$ células. Luego de centrifugar a 400 *g* durante 30 min a temperatura ambiente se recolectó cuidadosamente la interfase mononuclear. Esta fracción fue lavada 2 veces y resuspendida (aproximadamente 5×10^6 cél./ml) en α -MEM conteniendo SFB 30% y sulfato de gentamicina 0,05 g/l. Esta suspensión fue incubada durante la noche en placas de Petri de poliestireno a 37°C y 5% de CO₂ para separar las células adherentes (Sawada *et al*, 1987). Las células mononucleares no adheridas fueron lavadas 3 veces y recolectadas en medio de lavado. En cada paso se efectuaron recuentos y estudios de viabilidad celular.

II.b. Desarrollo de CFU-E humanas

Las células mononucleares no adherentes, obtenidas luego de la purificación de concentrados de sangre periférica, fueron cultivadas en medio semisólido α -MEM, conteniendo metilcelulosa 0,8%; *buffer* HEPES 25 mM; NaHCO₃ 26 mM; SFB 30%; L-

glutamina 2 mM; 2-mercaptoetanol 0,1 mM; sulfato de gentamicina 50 mg/l y apo-transferrina 1 μ M; en concentración final de 3,5x10⁵ cél./ml. Los cultivos fueron estimulados con las concentraciones de rHuEpo (Pronivel 1000, Elea SACIF y A) que se detallan en el Capítulo III, sección *II.d*. Un mililitro de medio semisólido conteniendo las células fue distribuido en placas de Petri de poliestireno para cultivo (“*untreated*”, 10x35 mm, Corning). Cada cultivo fue realizado por triplicado. Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 9 días en atmósfera conteniendo 5% CO₂ y 100% de humedad.

El recuento de CFU-E, colonias eritroides formadas por 8 o más células hemoglobinizadas, fue realizado como se describió en el capítulo I, con excepción de que el cromógeno utilizado en esta oportunidad fue 2,7-diaminofluoreno (DAF, Sigma Chemical Co). Este compuesto es oxidado debido a la actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina sobre el H₂O₂ y genera un compuesto coloreado azul fluoreno cuya concentración muestra una relación lineal con la concentración de hemoglobina presente. Este reactivo reemplaza a la bencidina por su mayor sensibilidad (Worthington *et al*, 1987).

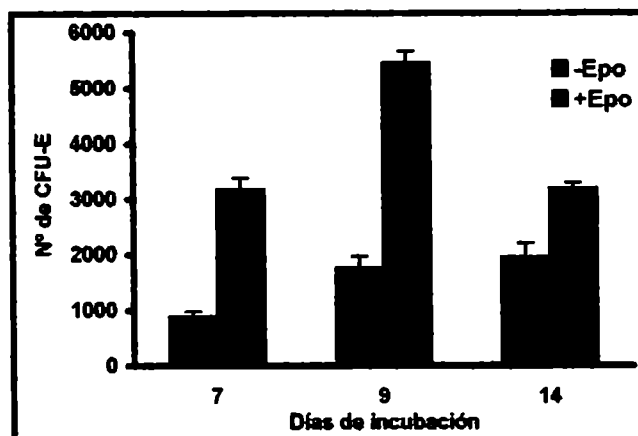
Las colonias eritroides fueron teñidas con DAF 0,9 μ g/l en *buffer* Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0 y contadas usando un microscopio invertido (Axiovert 135, Zeiss) con aumento 200x, calculándose la media geométrica (G) del número de CFU-E, a partir de triplicados.

II.c. Curva de calibración del tiempo de estimulación

Las CFU-E humanas difieren de las CFU-E de rata en el tiempo necesario para su diferenciación. Con el fin de determinar el tiempo óptimo de incubación de los progenitores para diferenciarse a CFU-E luego de la estimulación con Epo, se realizó una curva tiempo-respuesta.

Células progenitoras humanas purificadas (5x10⁵/ml) fueron cultivadas con 2 U Epo/ml y el número de CFU-E fue observado a los 7, 9 y 14 días.

Los resultados del desarrollo de colonias eritroides (G \pm S_c) correspondientes a un ensayo realizado por triplicado se observan en la Figura:



Tiempo de estimulación de progenitores eritroides humanos

El mayor desarrollo de CFU-E fue encontrado en el día 9 de estimulación, por lo cual fue considerado el tiempo óptimo de incubación para los próximos ensayos.

II.d. Curva de calibración dosis-respuesta con eritropoyetina

Como se mencionó anteriormente la diferenciación eritroide en rata difiere de la diferenciación en humano. Por esta razón se realizó una curva dosis respuesta entre 0 y 2 U Epo/ml, para evaluar la concentración óptima de Epo necesaria para estimular las CFU-E humanas.

La curva obtenida alcanzó un *plateau* entre las concentraciones 1,5 y 2 U Epo/ml. Esta última concentración fue considerada apropiada para realizar los cultivos.

III. LÍNEAS CELULARES

III.a. Línea celular humana eritroleucémica K562

Las células fueron adquiridas en el American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea fue establecida por Lozzio & Lozzio (1975) a partir de efusión de la pleura de una mujer con leucemia mieloide crónica en crisis blástica terminal. A través del estudio de las proteínas de membrana se demostraron características eritroleucémicas de estas células (Anderson *et al*, 1979). Además, expresan receptor para Epo (EpoR) en membrana, en bajo número (Fraser *et al*, 1988; Anagnostou *et al*, 1994) y poseen capacidad de sintetizar hemoglobina por estímulo de distintos inductores (Pérez *et al*, 2001).

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (pH 7,0±0,3; Sigma Chemical Co), conteniendo L-glutamina 2 mM; HEPES 25 mM y adicionado con NaHCO₃ 26,8 mM; SFB 10%; penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de 3x10⁵ cél./ml en estufa a 37°C en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO₂ (Pérez *et al*, 1999). El medio fue renovado cada 3 ó 4 días.

III.b. Línea celular humana de origen leucémico UT-7

Esta línea celular fue gentilmente cedida por el Dr. Patrick Mayeux (Cochin Hospital, Paris, Francia). Las células derivan de una muestra de m.o. de un hombre que padecía leucemia megaloblástica aguda (Komatsu *et al*, 1991). Esta línea que expresa elevado número de EpoR en membrana (Komatsu *et al*, 1991), requiere del suplemento de factores de crecimiento, tales como IL-3, factor estimulante de colonias granulocito-macrófago o Epo, para su proliferación y supervivencia. Las células fueron mantenidas en cultivo líquido en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) conteniendo L-glutamina 2 mM; HEPES 25 mM y suplementado con NaHCO₃ 36 mM; SFB 10%; Epo 2U/ml; penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (Komatsu *et al*, 1991). El medio fue renovado cada 3 ó 4 días.

IV. RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA

A continuación se describe la metodología utilizada para los estudios que involucran al receptor para Epo.

IV.a. Activación de ortovanadato de sodio

El ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) es un inhibidor de fosfatasa de tirosinas fosforiladas. Para obtener una inhibición máxima es necesario activar este compuesto (Gordon, 1991).

El pH de la solución de Na₃VO₄ fue ajustado a 10 utilizando soluciones de NaOH 1N o HCl 1N según requerimiento. A dicho pH la solución de Na₃VO₄ es amarilla. Luego, se calentó a ebullición hasta decoloración de la solución y se enfrió a temperatura ambiente. El pH fue nuevamente ajustado a 10. Este paso se repitió hasta que la solución se mantuvo incolora y el pH, estabilizado en 10. Se conservaron alícuotas a -20°C.

IV.b. Lisis celular

Las células (1×10^7) fueron lavadas 3 veces en PBS conteniendo Na_3VO_4 1 mM por centrifugación a 400 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, fueron lisadas con 200 μl de *buffer* hipotónico (Tris 50 mM, pH=8; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y Na_3VO_4 1 mM. Luego de 30 min de incubación a 0°C el material insoluble fue removido por centrifugación a 15000 g durante 15 min.

IV.c. Inmunoprecipitación

Los sobrenadantes resultantes de la lisis celular fueron diluidos a 1 ml con el *buffer* hipotónico (ver *IV.b*) e inmunoprecipitados con 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo policlonal anti-EpoR (Santa Cruz Biotechnology Inc) durante 1 h a 4°C bajo agitación constante. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 20 μl de una suspensión 1 mg/ml de proteína A agarosa (BD Biosciences) y, luego de una noche de incubación a 4°C, se colectaron los inmunoprecipitados por centrifugación a 15000 g, 15 min a 4°C, los cuales fueron lavados 2 veces en *buffer* hipotónico con inhibidores de proteasas.

IV.d. Transferencia y Western blot

El proceso completo -electroforesis, electrotransferencia e *immunoblotting*- fue explicado en detalle en el capítulo II, secciones *III.b y c*.

Brevemente, los inmunoprecipitados fueron solubilizados en 45 μl de *buffer* de muestra a ebullición durante 3 min y centrifugados a 15000 g, 15 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron analizados por SDS-PAGE (T 8%) y, posteriormente, electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (NC) durante 90 min.

La detección de las proteínas electrotransferidas a las NC se realizó con el equipo "ECL *Western blotting*" (Amersham Pharmacia Biotech). Esta técnica utiliza un método de emisión de luz para detectar antígenos específicos inmovilizados con un anticuerpo conjugado con peroxidasa.

Las NC fueron bloqueadas con agente bloqueante ECL 5% en TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T) durante 1 h, y luego, incubadas 1 h con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (Py) (BD Biosciences) diluido 1:1000 en TBS-T. Este anticuerpo detecta proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. Luego de un lavado en TBS-T durante 15 min y otros dos durante 5 min, las NC fueron incubadas 1 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech) diluido 1:1000 en TBS-T y, posteriormente, lavadas.

Una vez finalizados los lavados, las NC fueron reveladas en cuarto oscuro para visualizar las bandas inmunoreactivas. Las NC fueron puestas en contacto con el

sustrato quimioluminiscente ECL (luminol) durante 1 min y expuestas a placas Hyperfilm ECL en un *cassette* radiográfico durante distintos tiempos. Las membranas fueron reveladas en el laboratorio fotográfico.

IV.e. Stripping y reprobing

Después de efectuar el procedimiento anterior, las NC fueron utilizadas nuevamente con el fin de identificar las proteínas fosforiladas.

Para remover completamente el primer y segundo anticuerpo, las NC fueron incubadas en *buffer de stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM; SDS 2%; Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7) a 50°C por 30 min bajo agitación. Fueron lavadas 2 veces en TBS-T durante 10 min, a temperatura ambiente. Luego, las NC fueron nuevamente bloqueadas e incubadas durante la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-EpoR humano (Santa Cruz Biotechnology Inc) diluido 1:400 en TBS-T. Luego del lavado, fueron incubadas 1 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham Pharmacia Biotech) diluido 1:1000 en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente lavadas.

El revelado por quimioluminiscencia se efectuó como fue detallado en el punto anterior.

V. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO DEL RECEPTOR PARA ERTROPOYETINA

Para monitorear la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del receptor de Epo fue utilizada la técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). Esta técnica consta de un primer paso de transcripción reversa (RT), que consiste en la transformación de los ARNm en ácido desoxirribonucleico (ADN), llamado ADN copia (ADNc). Esto se realiza utilizando un oligonucleótido (*primer*) específico, oligo dT (complementario a las colas de poli A de los mensajeros). Una vez obtenido el ADNc, se amplifica la secuencia que corresponde al ARNm de interés por PCR, utilizando *primers* específicos. La técnica completa involucra varios pasos que son detallados a continuación.

V.a. Extracción de ARN total

El ARN total de 5×10^6 células fue extraído mediante incubación durante 5 min a temperatura ambiente con 0,5 ml de reactivo de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol Reagent, GibcoBRL) de acuerdo al método de Chomczynski & Sacchi (1987). Se agregó 0,1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s. Luego de 3 min,

se centrifugó 15 min a 9500 *g* a 4°C. Se descartó la fase orgánica. Se agregaron 0,25 ml de alcohol isopropílico a la fase acuosa y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se centrifugó 10 min a 9500 *g*.

El ARN contenido en el *pellet* fue lavado con 0,5 ml de etanol 75% agitado vigorosamente y centrifugado a 7500 *g* durante 5 min. El ARN fue disuelto en 30 μ l de agua conteniendo dietil pirocarbonato (DEPC, compuesto que destruye ARNasas, Amersham Pharmacia Biotech) 0,1%, v/v, e incubado 10 min a 60°C. Una alícuota de esta solución se utilizó para medir las absorbancias a 260 y 280 nm en espectrofotómetro. La concentración de ARN total fue calculada considerando que 1 unidad de densidad óptica corresponde a 40 μ g/ml de ARN simple cadena (Sambrook & Russel, 2001). La relación de A_{260}/A_{280} del ARN aislado se encontró entre 1,6 y 1,8. Estos valores concuerdan con los valores de preparaciones puras de ARN. En este paso se estudió la integridad del ARN mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) en *buffer* TEB (Tris 90 mM; EDTA 2 mM; ácido bórico 90 mM; pH 8 en H₂O-DEPC 0,1%, v/v) y bromuro de etidio 0,5 mg/l.

El ARN total (1 μ g) fue mezclado con 5 μ l de *buffer* de siembra (azul de bromofenol 0,25% (p/v); sacarosa 40% (p/v) en *buffer* TEB) y sembrado en el gel. La electroforesis se desarrolló a 280 V durante 25 min en una cuba electroforética Liberty 2 (Biokey American Instruments Inc). La integridad del ARN ribosomal (28S y 18S) fue observada mediante la detección de las bandas en un transiluminador (Hoefer Macro Vue UV-20) por observación de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ARN.

El ARN total fue fraccionado y conservado a -70°C hasta el momento de su utilización.

V.b. Obtención de ADN copia

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total extraído, por transcripción reversa de los ARNm utilizando oligo(dT) como *primer* y enzima transcriptasa reversa, empleando el *kit* optimizado “Ready To Go T-Primed First-Strand Kit” (Amersham Pharmacia Biotech).

La síntesis de ADNc fue realizada a partir de 2,5 μ g de ARN total, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

El ADNc fue fraccionado y conservado a -20°C hasta el momento de su utilización.

V.c. Diseño de primers

Las secuencias del ARNm de EpoR fueron obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI Sequence Viewer), del National Institute of Health, USA.

Los *primers* (Invitrogen Life Technologies) utilizados para amplificar la secuencia correspondiente al ARNm del EpoR fueron fabricados de acuerdo a Shimizu y colaboradores (1999). Este par de primers amplifica dos secuencias de distinta longitud del EpoR, una de 718 pares de bases (pb) que amplifica el ARN del receptor completo y otra de 813 pb que amplifica el ARN de un receptor truncado de Epo:

Forward 5'-TCTGAAGCAGAAGATCTGGCC-3'

Reverse 5'-GATCATCTGCAGCCTGGTGT-3'

Durante el proceso de PCR, se realizaron ensayos en paralelo utilizando como control semicuantitativo a la enzima glucolítica gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los *primers* (Invitrogen Life Technologies) para amplificar un fragmento de 240 pb de la secuencia de esta enzima fueron fabricados de acuerdo a McKinney & Robbins (1992):

Forward 5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G-3'

Reverse 5'-TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT-3'

V.d. Amplificación de los fragmentos de ADNc por PCR

Para comenzar la PCR, se preparó una mezcla de reacción en *buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM, conteniendo Taq polimerasa 25 U/ml (Amersham Pharmacia Biotech); *primers* 0,25 μM (Invitrogen Life Technologies) y dNTPs 200 μM (Amersham Pharmacia Biotech). Con el fin de optimizar las condiciones de amplificación, se estandarizaron las cantidades de ADNc inicial y temperatura de *annealing* (temperatura en la cual se unen los *primers* a las hebras de ADN) en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Una vez decididos estos parámetros se realizó una curva de número de ciclos térmicos para evaluar la cantidad óptima de ciclos a utilizar.

Las condiciones seleccionadas para amplificar cada secuencia (EpoR y GAPDH) se muestran en la siguiente tabla:

	EpoR (K562)	EpoR (UT 7)	GAPDH
ADNc inicial	1 μl	3 μl de dilución 1/10	2 μl de dilución 1/10
Desnaturalización inicial	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Cantidad de ciclos	35	25	28
Desnaturalización de cada ciclo	94°C, 20 s	94°C, 20 s	94°C, 30 s
<i>Primer annealing</i>	56°C, 30s	64°C, 30s	60°C, 40 s
Elongación	72°C, 40 s	72°C, 40 s	72°C, 60 s
Elongación final	60°C, 7 min	60°C, 7 min	72°C, 10 min

En cada ensayo de amplificación fue incluido un control negativo en el cual se excluyó el agregado de ADNc. El objetivo de este control fue comprobar que los diferentes reactivos empleados no se hubieran contaminado con ADN externo.

V.e. Análisis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) (Biodynamics SRL). Cada producto de PCR (10 µl) fue mezclado con 4 µl de *buffer* de siembra (ver *V.a*) y sembrado en el gel. En sendas calles, se sembraron un marcador de pb (Biodynamics SRL) para realizar el control del tamaño de los fragmentos amplificados y un control negativo de PCR. Para la electroforesis se emplearon las condiciones previamente descritas (sección *V.a*).

Los productos de amplificación obtenidos fueron detectados mediante la observación en un transiluminador (Hofer Macro Vue UV-20) de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ADNc. Los geles fueron fotografiados empleando una cámara digital (Kodak DC 120) y las fotografías, analizadas utilizando dos programas digitalizadores de imagen Array Gauge e Image Gauge (Fujifilm).

Los niveles de intensidad de las bandas del EpoR fueron normalizados por los valores correspondientes al estándar interno GAPDH (Sambrook & Russell, 2001).

V.f. Precauciones para mantener la calidad del procedimiento

Todos los procedimientos previamente descritos para la técnica de RT-PCR fueron realizados en gabinete de seguridad biológica tipo II empleando guantes descartables con el objeto de evitar la introducción de ARNasas foráneas.

El material plástico descartable utilizado para la extracción de ARN así como para las reacciones de RT-PCR, fue adquirido libre de enzimas que degradan ADN (ADNasas) y ARN (ARNasas).

El material plástico no descartable así como la cuba electroforética fueron tratados con una solución de NaOH 0,5 M durante 10 min con el objeto de inactivar ARNasas. Posteriormente, fueron enjuagados con H₂O-DEPC.

Todo el material plástico fue esterilizado por autoclavado.

VI. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DE LA ERITROPOYETINA

Se indujo apoptosis en células de la línea K562 con un agente externo, hemina (Sigma Chemical Co) (Benito *et al*, 1996). Se estudió la función antiapoptótica de la Epo utilizando la técnica de coloración de Hoechst (Wilson & Potten, 1999).

El colorante Hoechst N° 33258, (Trihidroclorhidrato de (2'-[4-Hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol)) (Sigma Chemical Co) es una sustancia que posee la capacidad de intercalarse entre las bases adenina (A) y timina (T) del ADN nuclear. El ADN teñido con el colorante Hoechst, cuando es excitado con luz apropiada ($\lambda=350\text{nm}$), emite fluorescencia de color azul brillante que puede ser observada mediante un microscopio de fluorescencia.

Un cubreobjetos, esterilizado por tratamiento con etanol 96° y calor, fue depositado dentro de una caja de Petri estéril de 35 mm de diámetro. Sobre el cubreobjetos, se depositó la suspensión celular (2×10^5 cél/ml) y se incubó durante 48 h en estufa a 37°C, en atmósfera con 5% CO₂ y 100% de humedad. Al finalizar ese período, se agregaron, lentamente, 5 gotas de fijador Carnoy (metanol:ácido acético glacial; 3:1 v/v) sobre la suspensión celular. Luego de 2 min, el medio de cultivo fue retirado aspirándolo desde los bordes del cubreobjetos con una pipeta tipo Pasteur, de manera que las células quedaran depositadas sobre el fondo. Se agregaron 2 ml de fijador Carnoy y se lo dejó actuar durante 5 min. Luego de efectuar un nuevo paso de fijación, el cubreobjetos se dejó secar al aire. Por tratarse de un agente intercalante de ADN, este colorante fue manipulado con guantes. La solución concentrada de colorante Hoechst (5 mg/l en solución salina balanceada de Hanks, sin rojo fenol) fue conservada protegida de la luz a 4°C. En el momento de realizar la coloración se preparó, a partir de la solución concentrada, una dilución de trabajo 1:50 en *buffer* McIlvaine (ácido cítrico 0,04 M; Na₂HPO₄ 0,12 M; pH 5,5). La solución diluida de colorante Hoechst fue depositada sobre el cubreobjetos, dejando reposar durante 10 min a temperatura ambiente en total oscuridad. Posteriormente, se lavó 3 veces con abundante agua destilada y se dejó secar al aire. El cubreobjetos fue montado con *buffer* McIlvaine en sentido invertido sobre un portaobjetos. La observación fue realizada en forma inmediata, empleando un microscopio de fluorescencia con magnificación de 400x (Axiovert, Zeiss), con filtro de excitación BP365 y filtro barrera LP397. El recuento diferencial de células (apoptóticas vs. no apoptóticas) se realizó analizando 600 células totales en cada preparado. Se obtuvieron microfotografías de células con características normales y células apoptóticas.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media aritmética y error estándar de la media ($\text{Media} \pm \text{SEM}$) como medidas de tendencia central y de dispersión. En ensayos individuales del desarrollo de CFU-E fue calculada la media geométrica y desviación estándar de la media geométrica ($G \pm S_G$) de los triplicados.

Las comparaciones estadísticas entre grupos fueron realizadas empleando la prueba t de Student, prueba de Welch y la prueba de Mann-Whitney, dependiendo de la existencia o no de normalidad y homogeneidad de la varianza de ambos grupos independientes.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar más de dos grupos independientes. De hallarse diferencias significativas, posteriormente, se realizó la prueba de Mann-Whitney entre dos grupos, para comparar distribuciones poblacional.

Los niveles de significación para establecer diferencias entre grupos se detallan en las figuras, tablas o texto.

Para describir el modelo lineal de asociación entre variables se calculó el coeficiente de correlación r de Pearson.

En los gráficos de *box plot* (Fig. I.3, I.5 y III.1) los límites inferior y superior de cada *box*, corresponden al primer y tercer cuartil de los datos obtenidos y las líneas verticales señalan el rango.

DESCARTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y RESIDUOS PELIGROSOS

El material que estuvo en contacto con el colorante de Hoechst y los geles conteniendo bromuro de etidio fueron inactivados bajo luz UV durante 1 h y, posteriormente, descartados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la F.C.E.yN.

Los líquidos biológicos y las células fueron descontaminados mediante el agregado de hipoclorito de sodio 5% durante 2 h.

Los animales de experimentación y el material de descarte (plástico, guantes, geles de poliacrilamida) fueron eliminados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la F.C.E.yN. De la misma forma fueron descartadas las soluciones de bencidina, DAF, Folin y las soluciones conteniendo solventes como metanol, ácido acético, etc.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

EFECTO POR EXPOSICIÓN CRÓNICA

A ALUMINIO IN VIVO

Trabajos previos realizados por distintos autores coinciden en señalar al Al como factor exógeno responsable de los signos de anemia desarrollados en animales expuestos al metal. Sin embargo, las alteraciones producidas no han sido estudiadas en conjunto.

Para evaluar el efecto de la sobrecarga oral de aluminio sobre la eritropoyesis, ratas Sprague Dawley recibieron citrato de aluminio 80 μM , en el agua de bebida durante un período prolongado de 8 meses, al cabo del cual se efectuaron ensayos para determinar el desarrollo de anemia y caracterizarla.

La concentración de aluminio en el agua de red fue, alrededor, de 5 μM y el contenido medio del metal en el alimento estándar recibido por todos los animales, de 10 $\mu\text{mol/g}$. Teniendo en cuenta la ingesta diaria, se calculó que cada rata del grupo Al recibió, al inicio del tratamiento, entre 11 y 18 μmol de Al/g de peso corporal/día mientras que las del grupo C ingirieron menos de 2 μmol de Al/g de peso corporal/día. El menor peso de las ratas expuestas a Al, detectado al finalizar el tratamiento experimental, sugiere un aumento progresivo de la dosis del metal por unidad de peso corporal, ya que no se observó disminución en la ingesta de líquido durante ese período.

PESO CORPORAL. FUNCIÓN RENAL

Los pesos de las ratas de 21 días de edad empleadas en esta investigación, se encontraban entre 93 y 109 g al comenzar la sobrecarga oral de Al.

Al cabo de 8 meses se observó un crecimiento dispar en ambos grupos. El peso corporal fue significativamente menor en el grupo de animales sometidos a tratamiento con Al con respecto al grupo control. Los pesos finales, expresados como Media \pm SEM, fueron 272 \pm 25 g para el grupo que ingirió Al (n=10) y 361 \pm 38 para el grupo control (n=8) (P<0,001; prueba de Mann-Whitney).

La función renal de los animales que ingirieron Al no fue alterada por el tratamiento,

ya que la concentración de urea en sangre al final del período experimental fue, en promedio, 8,3 entre 7,8-8,9 mmol/l en el grupo control y 8,0 entre 7,3-9,0 mmol/l en el grupo de ratas que recibieron Al.

DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS

En la Tabla I.1 se resumen los resultados de las determinaciones de volumen globular, concentración de hemoglobina sanguínea y recuento de reticulocitos, efectuadas en los animales de ambos grupos experimentales al finalizar el período de sobrecarga oral con Al.

Se encontraron diferencias entre ambos grupos para los tres parámetros estudiados. Resultaron estadísticamente significativos el descenso de hematocrito y hemoglobinemia asociados al aumento del porcentaje de reticulocitos en el grupo de animales que recibieron Al.

Tabla I.1: Parámetros hematológicos

	Hematocrito (%)	Hemoglobinemia (g/d)	Reticulocitos (%)
Control (n=8)	43,6 ± 1,07	146 ± 2,8	1,2 ± 0,07
Aluminio (n=10)	38,8 ± 1,43*	135 ± 2,7*	1,8 ± 0,15**

Los resultados se expresan como Media ± SEM de los grupos control y tratado con citrato de Al.

** Diferencias significativas (P<0,05) con respecto a los controles (Prueba de Mann-Whitney).*

*** Diferencias significativas (P<0,01) con respecto a los controles (Prueba de Welch).*

La intoxicación por aluminio produce alteraciones de los parámetros hematológicos compatibles con anemia: descenso del volumen globular y de los niveles de hemoglobinemia, así como aumento en el número de reticulocitos circulantes.

PARÁMETROS INDICADORES DE HEMÓLISIS INTRAVASCULAR

Teniendo en cuenta la disminución del volumen globular y de la hemoglobinemia y el

aumento de reticulocitos en el grupo de animales expuestos a Al, se realizaron determinaciones para caracterizar el tipo de anemia (Tabla I.2).

La concentración de haptoglobina, medida por la técnica de inmunodifusión radial en el plasma de los animales tratados, mostró significativo descenso con respecto a la de los controles.

No se encontró una diferencia apreciable en los niveles de hemoglobina plasmática entre ambos grupos.

Tabla I.2: Parámetros indicadores de hemólisis intravascular

	Haptoglobina (g/l)	Hemoglobina en plasma (mg/l)
Control (n=8)	1,5 ± 0,08	81 ± 18,1
Aluminio (n=10)	1,0 ± 0,06*	83 ± 6,5

Los resultados se expresan como Media ± SEM de los grupos control y tratado con citrato de Al.

** Diferencias significativas (P<0,005) con respecto a los controles (Prueba t de Student).*

La prueba de reducción de metahemoglobina fue realizada para determinar si el tratamiento con Al había afectado la actividad eritrocitaria de la enzima G6PD (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa). En las muestras de sangre de los animales tratados y de los controles se obtuvieron resultados similares por lo que se puede inferir que el Al no ejerció un efecto sobre esta enzima.

La disminución significativa de la concentración de haptoglobina junto con el hallazgo de reticulocitosis concuerdan con el desarrollo de anemia de tipo hemolítico en los animales sobrecargados con aluminio.

MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA

La morfología de glóbulos rojos de sangre periférica de los animales sobrecargados con citrato de Al fue estudiada por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB). Esta última técnica tiene la ventaja de proveer una imagen de gran

magnitud de la superficie celular en perspectiva.

Los frotis de sangre periférica de los animales controles fueron clasificados como normocíticos y normocrómicos (tamaño y aptencia tintorial de las células normales), observándose la forma típica bicóncava de los hematíes. Contrariamente, en los extendidos pertenecientes a los animales expuestos a Al, se observó variación en la coloración (anisocromía), una marcada dispersión en el diámetro celular (anisocitosis) y presencia de células con diversas formas (poiquilocitosis).

Las diferencias morfológicas fueron corroboradas por MEB. En los preparados correspondientes a los animales que ingirieron Al se observó la presencia de numerosos dianocitos, esquistocitos, acantocitos y otras anomalías morfológicas, además de las evidentes diferencias de tamaño de las células.

La serie de microfotografías que se incluyen y describen a continuación son representativas de los numerosos campos microscópicos examinados. La depresión central característica de los eritrocitos normales (Fig. I.1.a y I.2.a) fue reemplazada en los dianocitos por una protuberancia (Fig. I.1.b) y se observaron acantocitos, células que presentan márgenes irregulares y número variable de salientes (Fig. I.1.d y I.2.d). Numerosos eritrocitos perdieron la forma bicóncava característica. No sólo se encontraron eritrocitos planos o leptocitos (Fig. I.1.b, d y I.2.b) sino también células con más de dos concavidades (Fig. I.2.c). En muchos campos microscópicos pudo advertirse la presencia de glóbulos rojos con otras morfologías atípicas (Fig. I.1.c y I.2.d)

La intoxicación crónica por aluminio produce marcadas alteraciones morfológicas de los eritrocitos circulantes de animales de experimentación, observadas por microscopía óptica y corroboradas por MEB.

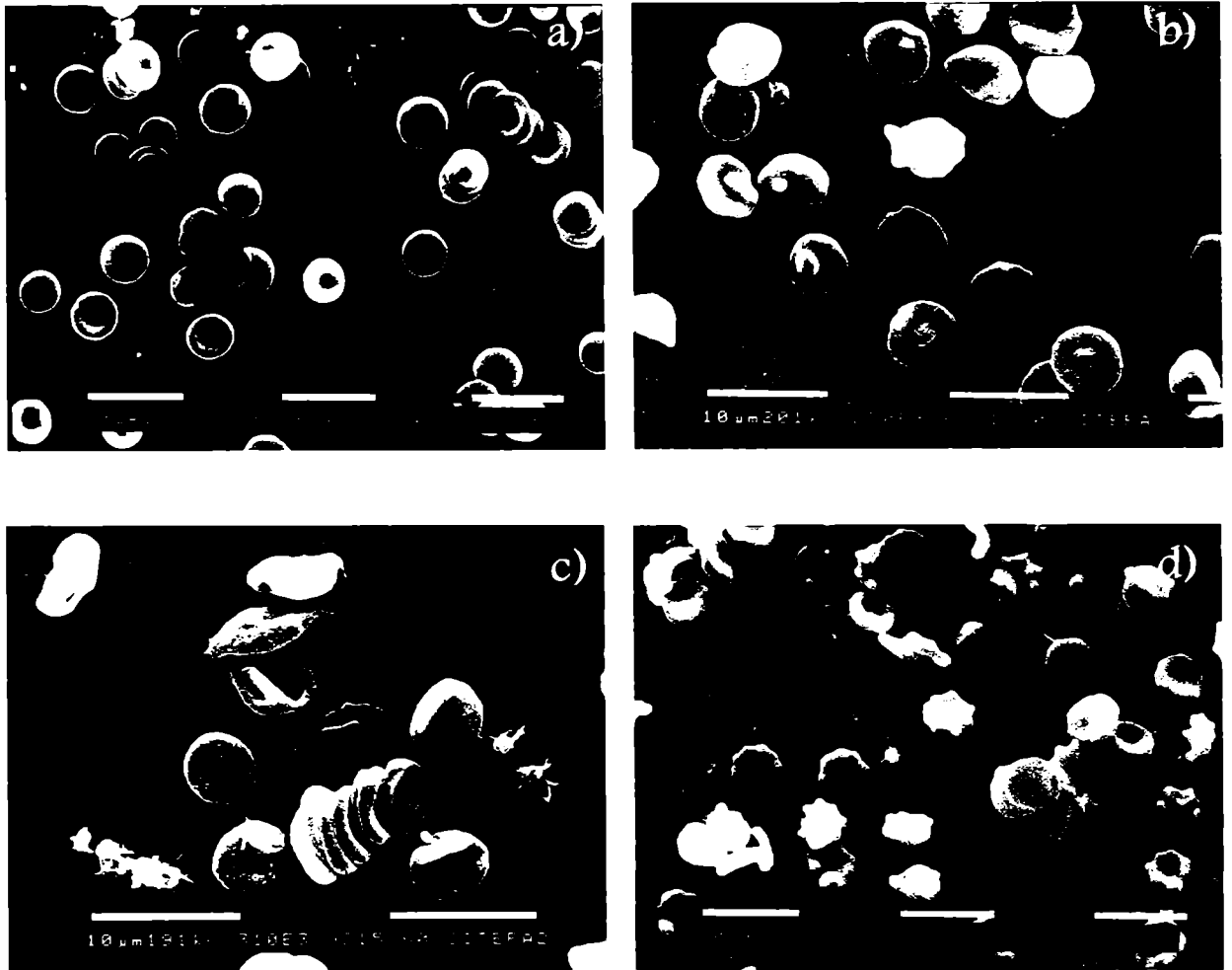


Figura I.1

Efecto de la administración de aluminio sobre la morfología de eritrocitos de sangre periférica observados por MEB

Morfología de eritrocitos de animales controles (a) y de los que ingirieron solución de aluminio (b-d). a) Morfología normal (2020x); b) Poikilocitosis, observándose numerosos dianocitos y leptocitos (2500x); c) Aspecto general del extendido mostrando distintas alteraciones (3100x); d) Presencia de acantocitos y leptocitos (2020x).

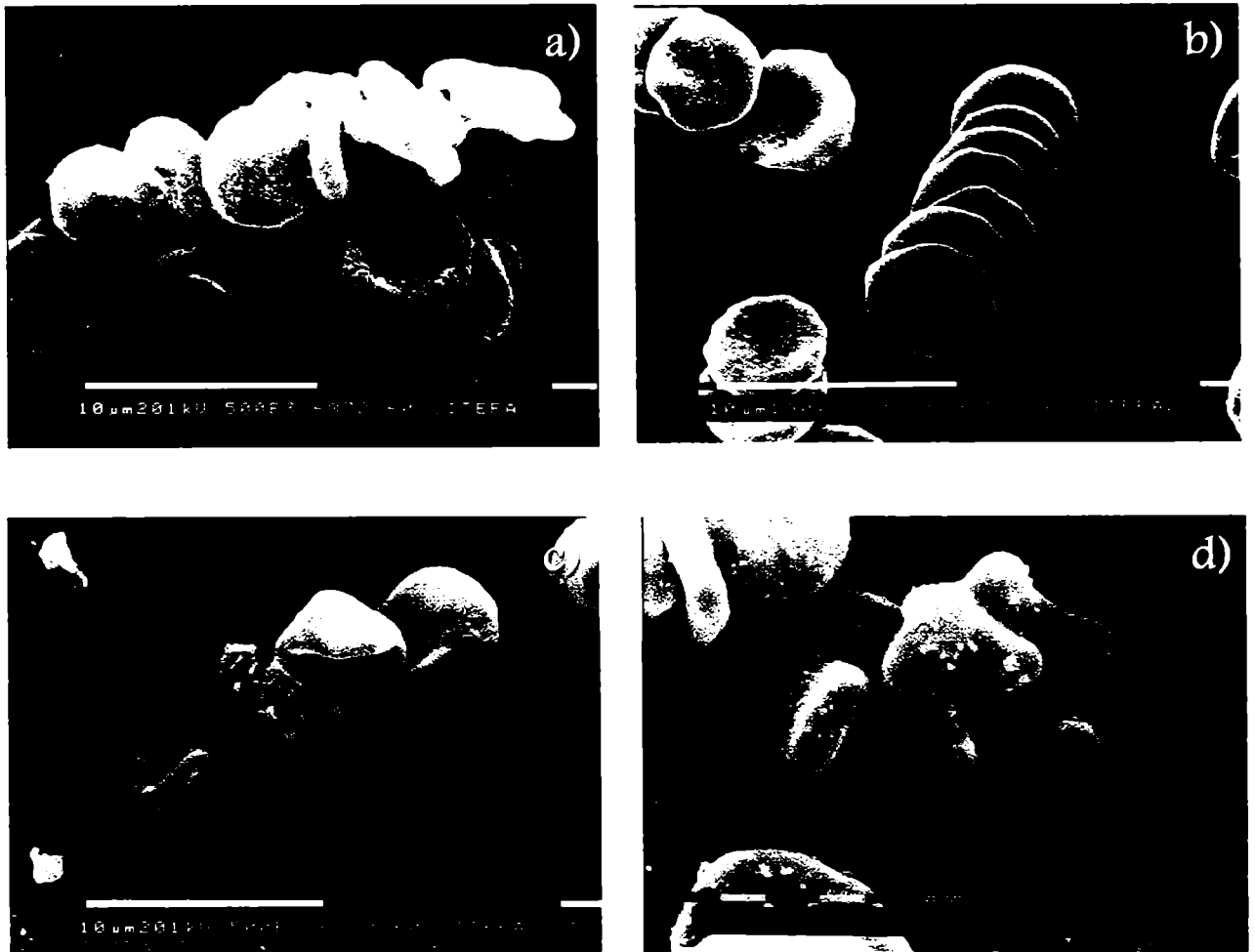


Figura I.2

Efecto de la administración de aluminio sobre la morfología de eritrocitos de sangre periférica observados por MEB

Morfología de eritrocitos de animales controles (a) y de los que ingirieron solución de aluminio (b-d).
 a) Morfología normal (5000x); b) Cúmulo de leptocitos (5000x); c) Eritrocitos con más de dos cavidades (5000x); d) Detalle de acantocito y célula con protuberancia (10000x).

DESARROLLO DE CFU-E

Las células progenitoras eritroides CFU-E, localizadas en médula ósea, se diferencian a células maduras del linaje eritroide ante el estímulo de la hormona eritropoyetina (Epo).

Para evaluar los efectos *in vivo* del Al sobre los progenitores eritroides de médula ósea al finalizar el período prolongado de tratamiento, se realizaron cultivos *in vitro* de CFU-E estimulados con Epo.

La Figura I.3 muestra la respuesta de las CFU-E a Epo, en cultivos de células de m.o. provenientes de los animales de ambos grupos experimentales.

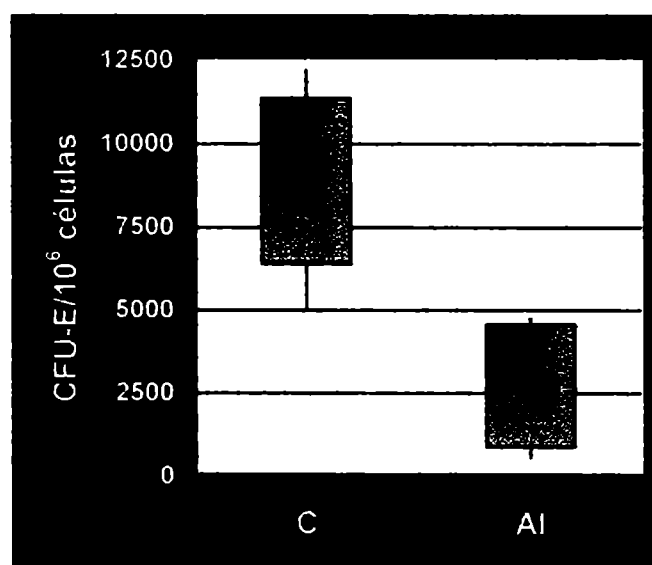


Figura I.3

Efecto de la administración de aluminio sobre la respuesta de CFU-E a eritropoyetina

*Células de médula ósea (2×10^5 /ml) de ratas controles (C, $n=8$) y sobrecargadas con citrato de aluminio durante 8 meses (Al, $n=10$) fueron estimuladas *in vitro* con 0,25 U Epo/ml y cultivadas en medio semisólido durante 48 h a 37°C, en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO₂. El número de CFU-E fue determinado por observación microscópica después de reacción con bencidina. La disminución observada fue estadísticamente significativa ($P < 0,005$) con respecto al control (Prueba t de Student).*

El desarrollo espontáneo de CFU-E fue determinado en cultivos sin Epo. Los resultados, expresados como Media \pm SEM, fueron 1980 ± 270 CFU-E/ 10^6 células de animales controles y 1550 ± 220 CFU-E/ 10^6 células de ratas expuestas a Al, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. Se observó un significativo estímulo

producido por Epo sobre células progenitoras de médula ósea de los animales que no ingirieron Al con respecto al crecimiento espontáneo de CFU-E en cultivos sin Epo ($P < 0,005$). La Figura 1.3 muestra la severa inhibición, de 67% con respecto a los controles, de la respuesta a Epo de CFU-E provenientes de animales expuestos al metal ($P < 0,005$).

La significativa inhibición del desarrollo de CFU-E en cultivos in vitro refleja la importante alteración del comportamiento de los progenitores de médula ósea en su respuesta a la eritropoyetina, como consecuencia de la sobrecarga oral crónica con aluminio.

TRANSPORTE Y DEPÓSITOS DE HIERRO

La Tabla 1.3 muestra los datos de ferremia (Fe), capacidad total de fijación de hierro (CTFFe) y porcentaje de saturación de transferrina con hierro (Sat.Tf-Fe) determinados al finalizar el período experimental de sobrecarga oral con Al. Estos parámetros no mostraron diferencias significativas cuando se compararon ambos grupos de animales, indicando que la ingestión de Al no indujo deficiencia de Fe.

Tabla 1.3: Metabolismo del hierro

	Fe mg/l	CTFFe mg/l	Sat.Tf-Fe %
Control (n=8)	3,36 ± 0,09	6,31 ± 0,39	59 ± 4,8
Aluminio (n=10)	3,10 ± 0,22	5,54 ± 0,30	56 ± 3,3

Los resultados se expresan como Media ± SEM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tratado con citrato de Al.

Para complementar el estudio de los posibles efectos del Al sobre el metabolismo del Fe, se investigaron los depósitos de este metal en células de médula ósea empleando la coloración de azul de Prusia. Los resultados, observados al microscopio óptico, pueden

ser apreciados en la Figura I.4. Los campos fotografiados son representativos de los más frecuentemente observados en las muestras de cada grupo.

La observación microscópica de los extendidos de médula ósea reveló, en los preparados de muestras provenientes de animales tratados con Al, sideroblastos que contenían más de 5 gránulos pequeños, lo que es considerado una acumulación anormal de Fe (Fig. I.4.b-d).

Por otra parte, se observaron sideroblastos en anillo, que son eritroblastos en los cuales cinco o más gránulos forman un anillo parcial o total alrededor del núcleo (Fig. I.4.c). La presencia de al menos una célula con estas características también se considera acumulación excesiva de Fe.

La ingestión prolongada de aluminio no modifica las concentraciones de hierro circulante, a la vez que induce la acumulación de hierro en células de médula ósea.

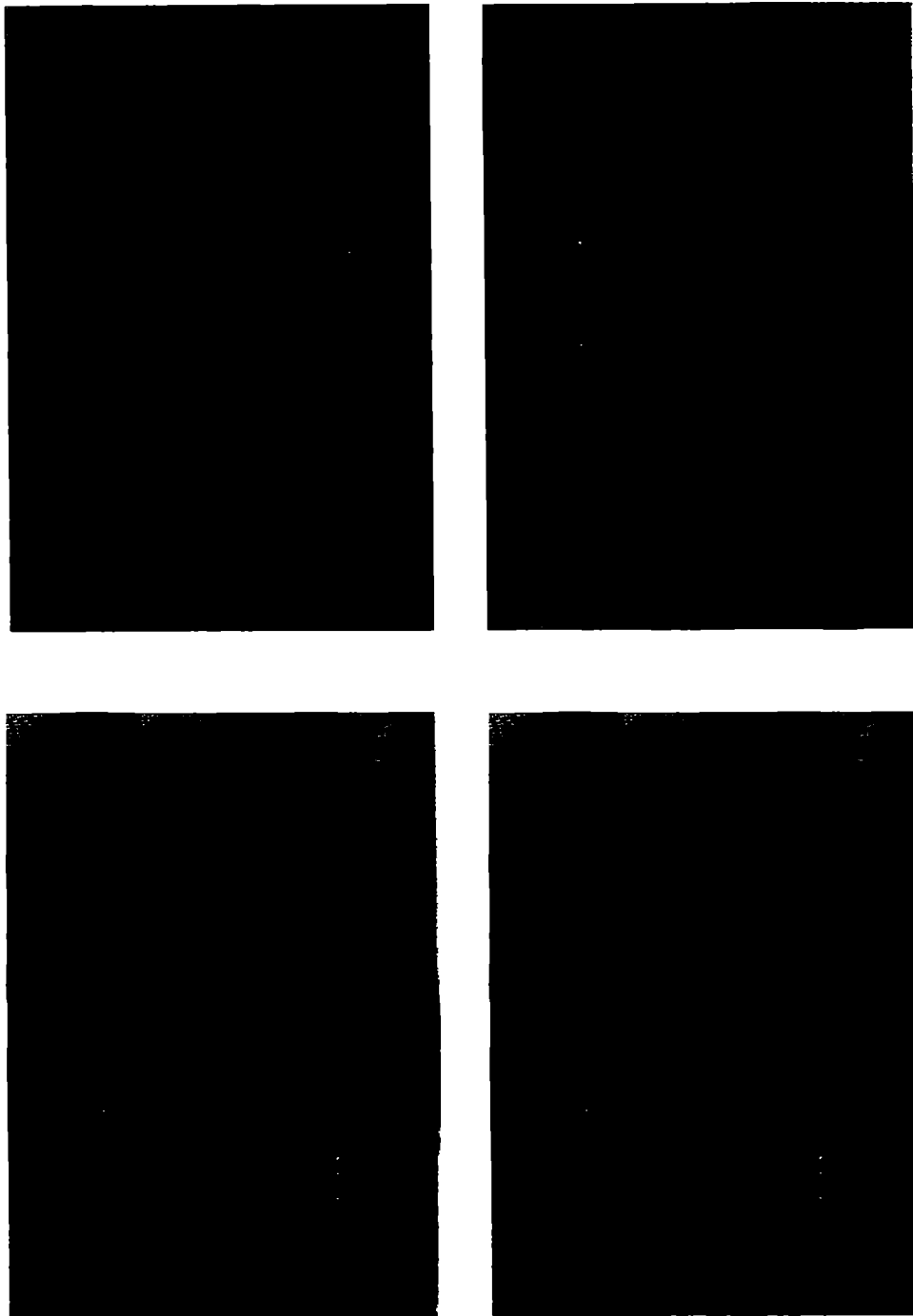


Figura I.4

Investigación de depósitos de hierro en médula ósea

Los extendidos de médula ósea fueron coloreados con azul de Prusia para poner de manifiesto el contenido de hierro intracelular. Se utilizó safranina como colorante de contraste.

a) Fotografía de células de médula ósea de animales controles, representativa de todos los extendidos. No se observan sideroblastos (1000x). b-d) Fotografías de células de médula ósea de animales tratados con solución de aluminio. b) Grupo de sideroblastos con pequeños gránulos (1000x); c) sideroblasto con numerosos gránulos gruesos en anillo (1000x); d) Depósitos intracelulares de hierro (630x).

ALUMINIO EN EL ORGANISMO

Aluminio en plasma y tejidos

En la Tabla I.4 se puede comparar la distribución de Al en el organismo entre los animales tratados y los controles. La concentración del metal se encontró significativamente aumentada en plasma y en los tejidos obtenidos de los animales que habían ingerido solución de citrato de aluminio.

Tabla I.4: Contenido de aluminio en plasma y tejidos

	Control (n= 8)	Aluminio (n= 10)
Hueso‡	21,6 ± 4,8	95,4 ± 5,7†
Bazo‡	36,5 ± 6,1	176,2 ± 48,0*
Riñón‡	22,6 ± 2,9	86,2 ± 20,4*
Cerebro‡	11,7 ± 2,5	26,6 ± 5,4**
Hígado‡	14,9 ± 3,3	39,7 ± 6,8§
Plasma (µg/l)	28,7 ± 13,7	321 ± 82,5*

Los resultados se expresan como Media ± SEM.

‡ El contenido de aluminio en los órganos se expresa en µg/g de tejido seco.

† Diferencias significativas (P<0,001) con respecto a los controles (Prueba t de Student).

** y ** Diferencias significativas (P<0,001 y P<0,05, respectivamente), con respecto al grupo control (Prueba de Mann-Whitney).*

§ Diferencias significativas (P<0,01) con respecto a los controles (Prueba de Welch).

Los resultados comparativos entre ambos grupos experimentales, que se presentan en la Figura I.5. graficos a-f, muestran una importante acumulación de Al en el organismo de las ratas tratadas con el metal.

La intoxicación por aluminio durante 8 meses se refleja en la elevada concentración de aluminio circulante, así como en una acumulación significativa del contenido del metal en todos los órganos analizados.

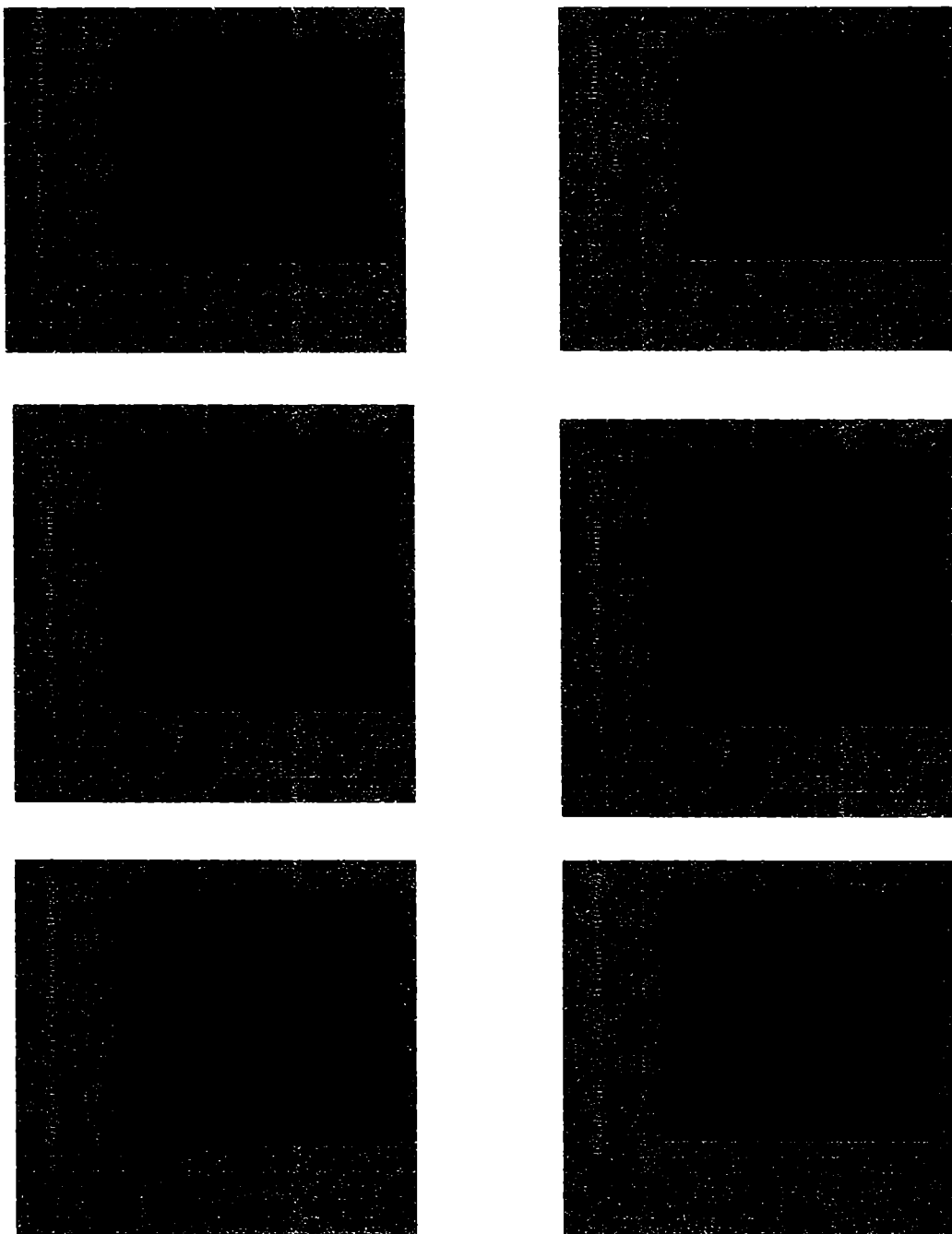


Figura I.5

Concentración de aluminio en plasma y tejidos

El contenido de Al se determinó en plasma y, luego de destrucción de la materia orgánica, en tejidos provenientes de animales controles y tratados con citrato de Al, empleando espectrometría de absorción atómica.

Aluminio intracelular

La composición de cationes dentro de eritrocitos de sangre periférica fue obtenida por medición de energía dispersada de rayos X (EDAX) en MEB. Los resultados se muestran en forma de mapas cualitativos en las Figuras I.6 a I.10. En cada una se adjunta la fotografía en la que se indica la célula específica a la cual se le aplicó el haz de electrones.

En todos los mapas aparecen los picos correspondientes al silicio, elemento provisto por el vidrio donde se preparó la muestra y los picos correspondientes al oro y al paladio, metales utilizados para recubrir los preparados. La energía correspondiente al Al está comprendida entre las del Mg y el Si.

El Al se detectó en acantocitos y esquistocitos provenientes de animales que recibieron el tratamiento con citrato de Al (Fig. I.6 y I.7).

El pico correspondiente al Al no se observó en células atípicas de animales controles (Fig. I.10), ni en eritrocitos con morfología normal, ya fueran de animales controles (Fig. I.9) o de animales tratados (Fig. I.8).

El aluminio ha sido detectado en el interior de eritrocitos con formas anómalas de los preparados de sangre de los animales expuestos al metal, por la técnica de EDAX, no así en eritrocitos con morfología normal provenientes de ambos grupos experimentales.

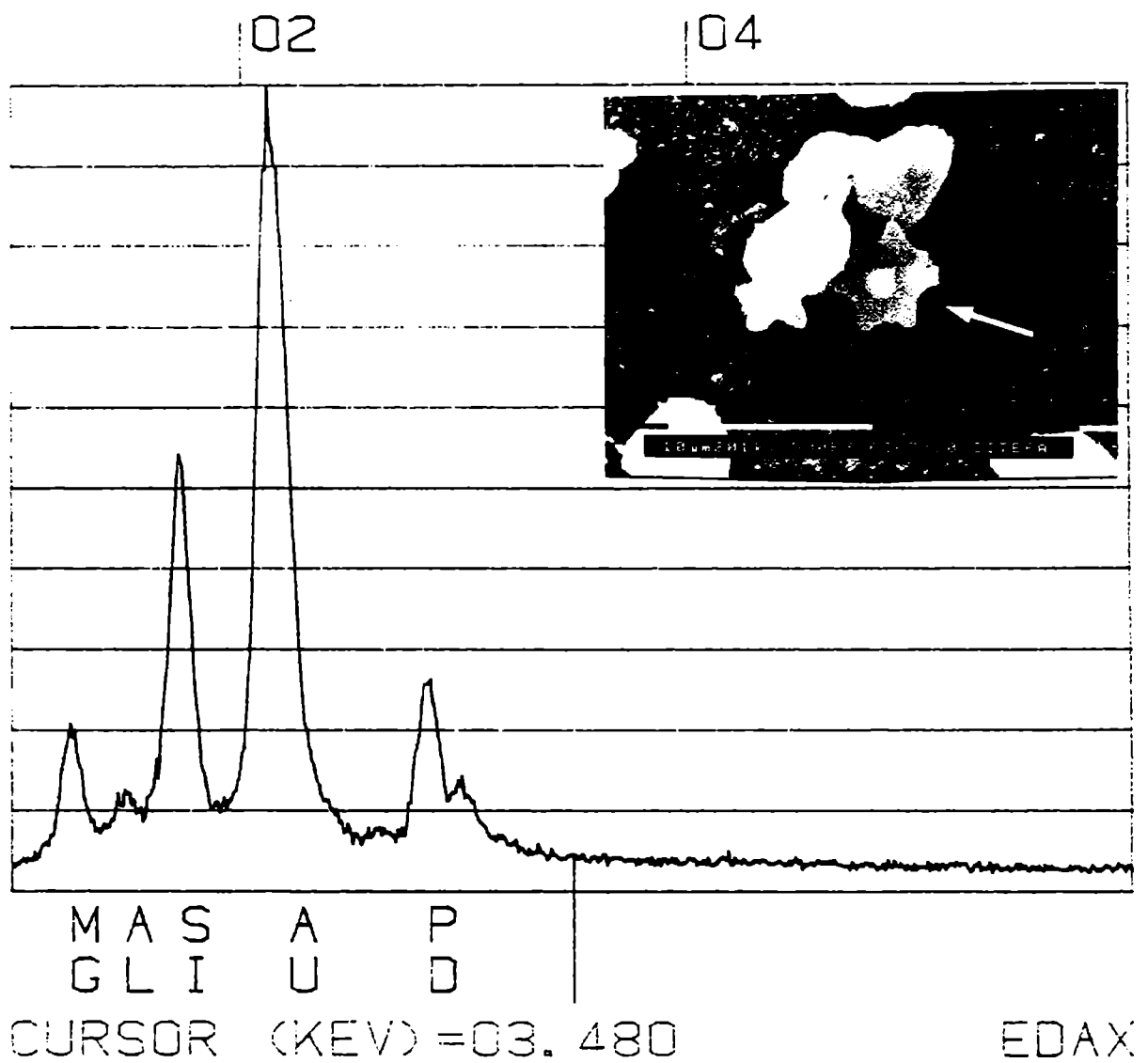


Figura I.6

Detección de aluminio intracelular

Espectro de emisión de rayos X (EDAX) en eritrocito crenado de un animal tratado con solución de aluminio. Se destaca la presencia de aluminio. La flecha en la fotografía indica el eritrocito bombardeado por el haz de electrones.

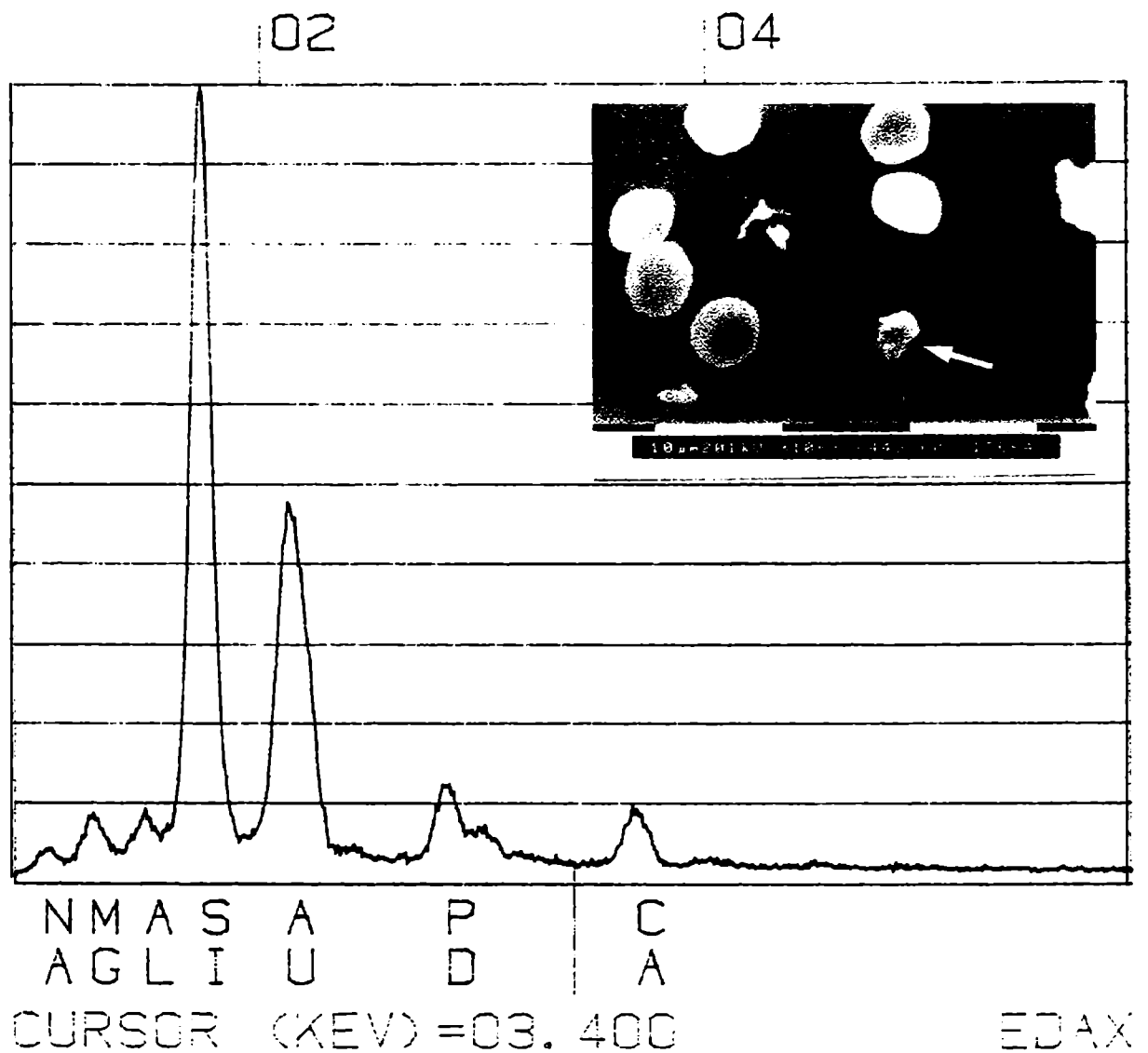


Figura I.7

Detección de aluminio intracelular

Espectro de emisión de rayos X (EDAX) en esquistocito de un animal tratado con solución de aluminio. Se destaca la presencia de aluminio. La flecha en la fotografía indica el eritrocito bombardeado por el haz de electrones

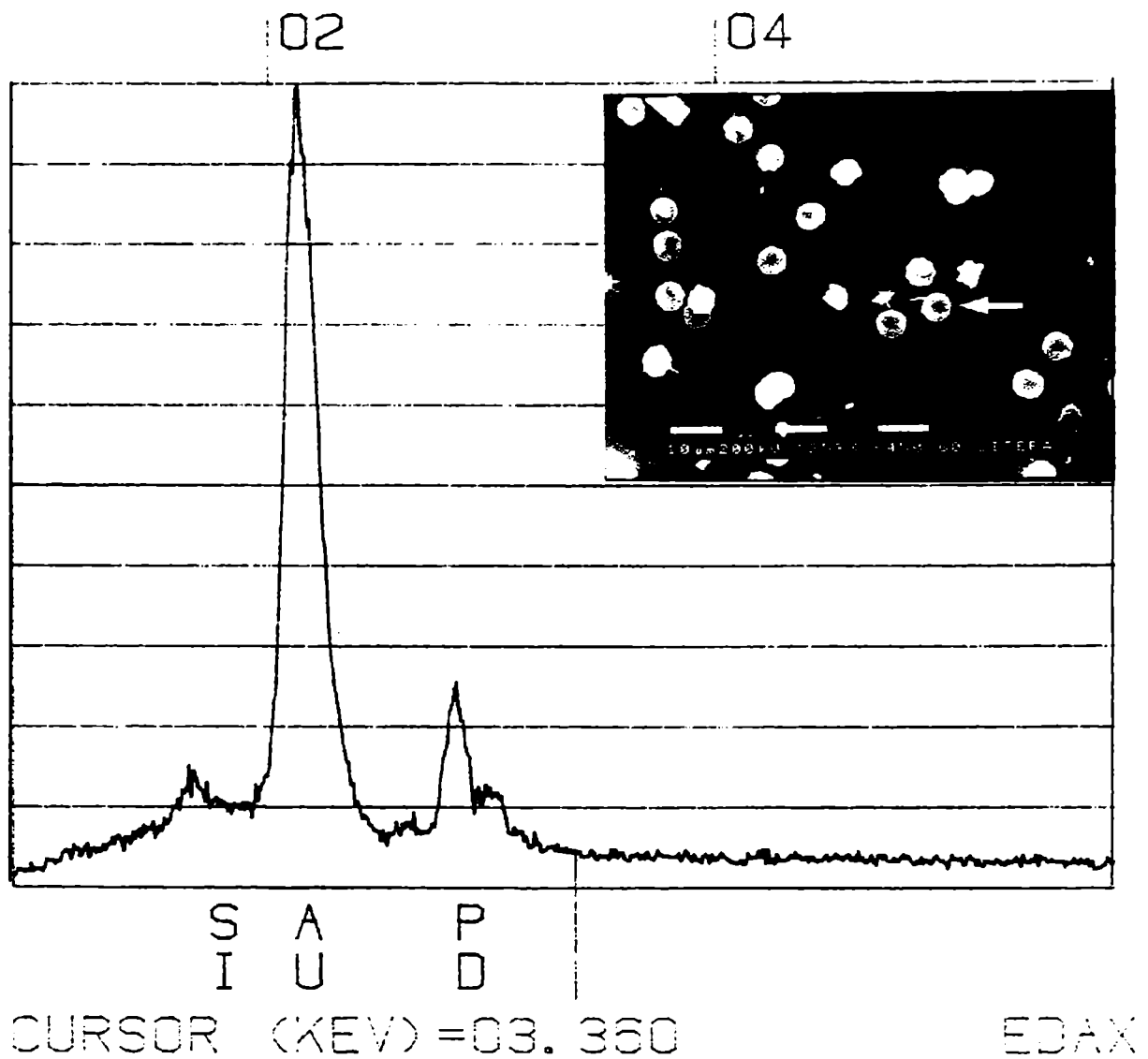


Figura I.8

Detección de aluminio intracelular

Espectro de emisión de rayos X (EDAX) en eritrocito con morfología normal de un animal tratado con solución de aluminio. Se observan únicamente los picos de identificación de silicio, oro y paladio. La flecha en la fotografía indica el eritrocito bombardeado por el haz de electrones.

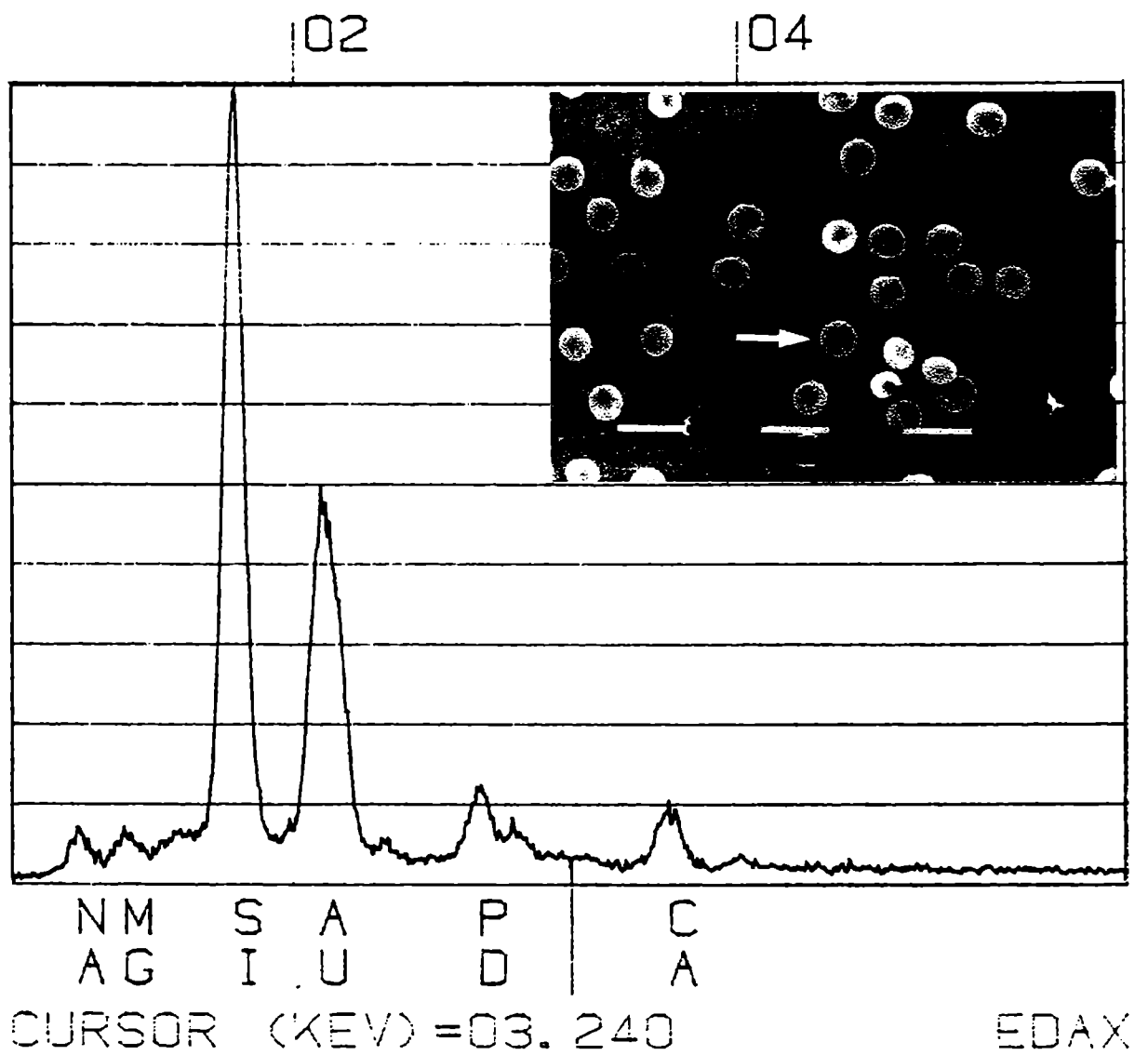


Figura I.9

Detección de aluminio intracelular

Espctro de emisión de rayos X (EDAX) en eritrocito normal de un animal control. No se detectó aluminio.

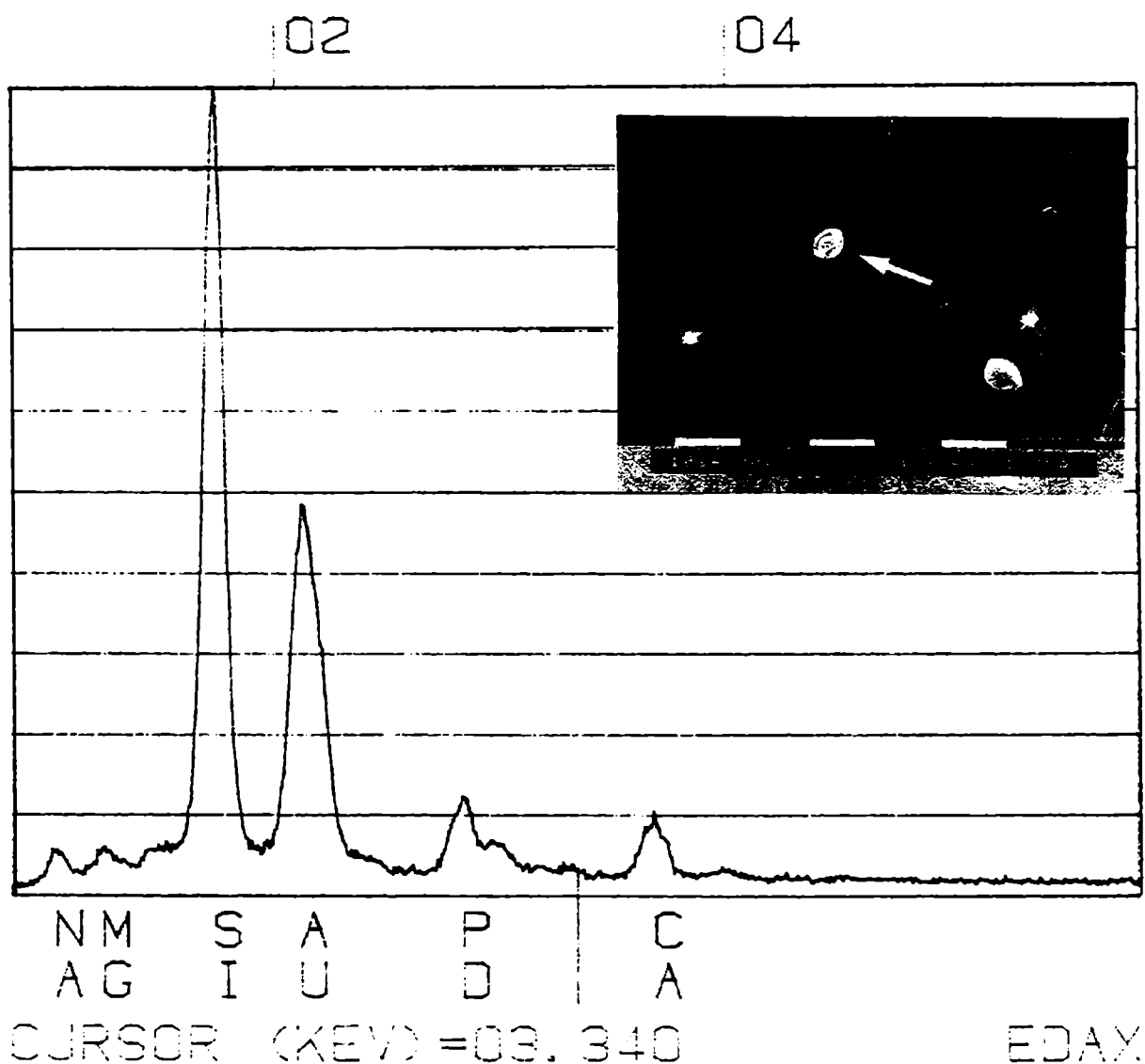


Figura I.10

Detección de aluminio intracelular

Espectro de emisión de rayos X (EDAX) en eritrocito con forma atípica perteneciente a un animal control. No se detectó aluminio.

DISCUSIÓN

El modelo experimental usado en este trabajo puede asemejarse a la condición particular de pacientes con función renal normal que reciben preparaciones farmacéuticas que contienen aluminio y citrato, o a la de otros pacientes con niveles de exposición semejantes.

Las dosis de citrato de aluminio ingeridas por las ratas oscilaron entre 11 y 18 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal/día. Esta dosis fue elegida sobre la base de la administración terapéutica usual de fármacos antiácidos que recibe la población con función renal normal, así como de la prescripción de secuestrantes de fosfatos a los pacientes con insuficiencia renal crónica. Teniendo en cuenta las cantidades de los compuestos de aluminio generalmente prescritas (Recker *et al*, 1977; Kaehny *et al*, 1977; Nestel *et al*, 1988; Tsou *et al*, 1991), se puede estimar que esos individuos ingieren entre 0,2 y 13 $\mu\text{mol Al/g}$ de peso corporal/día. También se adoptó, en el presente diseño experimental, una ruta de ingreso del tóxico que simulara la vía de administración que se emplea habitualmente en el ser humano.

El significativo retraso en el crecimiento de los animales expuestos a Al podría haber sido causado por disminución de la ingesta de alimentos, por interferencia de la absorción intestinal de nutrientes, o por la ocurrencia de ambos procesos. Considerando que el aporte del metal por el alimento sólido fue, aproximadamente, cuatro veces menor que el recibido por la bebida, una disminución de la ingesta de alimentos no hubiera causado una merma significativa en la dosis de Al, ya que el volumen de líquido ingerido diariamente por los animales de ambos grupos no difirió significativamente.

La inhibición significativa del desarrollo normal de los animales que ingirieron aluminio proporciona un signo, no descrito anteriormente y que merece ser estudiado en profundidad, acerca de los efectos nocivos que se pueden producir por exposición crónica a aluminio sobre el aporte nutricional.

Los resultados llaman la atención sobre el riesgo de concentración de aluminio tras la exposición por vía oral. En los animales expuestos, hueso, bazo y riñón fueron los tejidos especialmente proclives al depósito de aluminio. En cerebro e hígado la acumulación fue menor, aunque significativamente mayor que la de los animales controles.

El hallazgo de elevadas concentraciones plasmáticas y tisulares de aluminio (Tabla I.4, Fig. I.5) demuestra que una la función excretoria renal intacta no asegura la completa remoción del aluminio circulante. La concentración plasmática refleja las cantidades circulantes del elemento al momento de la extracción. Por lo tanto, no está directamente relacionada con la dosis de exposición recibida por el organismo. Esa concentración tampoco permite estimar el grado de acumulación en los tejidos, ya que no se ha podido demostrar, ni en este trabajo ni en otros anteriores (Garbossa *et al*, 1998b), correlación entre la concentraciones plasmáticas y las concentraciones tisulares de aluminio. Sin embargo, un elevado nivel de aluminio en plasma es un índice útil para mostrar contacto previo del individuo con el metal y podría constituir un «marcador de exposición» (Sampson *et al*, 1994).

El tejido óseo es un compartimiento de acumulación profunda; la concentración tisular no se modifica después de interrumpir la exposición y, aún cuando la función excretoria renal se halle intacta, el metal acumulado no puede ser eliminado espontáneamente en su totalidad (Ellis *et al*, 1979). Esto se debe, probablemente, a las características de la inclusión de los compuestos de aluminio en la matriz ósea. En consecuencia, la concentración de aluminio en hueso podría resultar un mejor «marcador de dosis interna» que la concentración plasmática.

El estudio de los efectos que la exposición crónica a aluminio produce sobre la eritropoyesis, reveló el desarrollo de una anemia moderada, reflejada en la disminución de los valores de hematocrito y de hemoglobinemia (Tabla I.1).

La presencia de un “componente hemolítico” en la alteración hematológica inducida por exposición a aluminio fue evidente con los resultados de una significativa disminución de la concentración plasmática de haptoglobina (Tabla I.2). La disminución de haptoglobina es un parámetro específico de medición del proceso de destrucción celular (Lee, 1993). En condiciones normales, la destrucción de los glóbulos rojos ocurre sin liberación de hemoglobina al plasma. La mayor parte del proceso destructivo es extravascular y se produce en los macrófagos esplénicos. El sistema enzimático responsable de la degradación de hemoglobina está localizado en las células fagocíticas del bazo, hígado y médula ósea. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias puede ocurrir un fenómeno de destrucción intravascular de los glóbulos rojos. Cuando ocurre esta situación, la hemoglobina es descargada directamente en el plasma donde se une a la haptoglobina para formar, de manera irreversible, el complejo hemoglobina-haptoglobina. El catabolismo de este complejo se desarrolla en las células del parénquima hepático. Esto explica por qué el nivel de

haptoglobina puede encontrarse disminuido después de una crisis hemolítica, aún en casos leves de hemólisis intravascular (Dacie & Lewis, 1995).

La presencia de esquistocitos y de células con más de dos concavidades en los preparados de animales expuestos a aluminio apoya también la suposición de la existencia de un cuadro hemolítico. Estas son sólo algunas de las alteraciones morfológicas de los eritrocitos observadas en las ratas que ingirieron aluminio.

Por microscopía óptica y, especialmente, por microscopía electrónica de barrido fue notable la presencia de anisocitosis y poquilocitosis. Fueron encontrados numerosos dianocitos (Fig. I.1.b), leptocitos (Fig. I.1.b,c y I.2.b), acantocitos (Fig. I.1.d y I.2.d) y esquistocitos (Fig. I.1.c). El hallazgo más relevante fue, entonces, la observación frecuente de la pérdida de la forma típica bicóncava con la aparición de numerosas células atípicas.

Se ha descrito que la presencia de esquistocitos sugiere trauma físico y que poiquilocitosis y acantocitosis son indicativos de alteración en la composición lipídica de la membrana. Además, se ha descrito que acantocitos, dianocitos (Lukens, 1993) y leptocitos (Lee, 1993), tienen mayor resistencia osmótica. En trabajos anteriores se encontró disminución de la fragilidad osmótica de glóbulos rojos de ratones (Garbossa *et al*, 1996) y de ratas (Garbossa *et al*, 1998a) con función renal normal expuestos a aluminio, hecho que se tradujo en un acortamiento de la vida media eritrocitaria (Garbossa *et al*, 1998a). Drüeke y colaboradores (1986b) también observaron disminución de la fragilidad osmótica de los eritrocitos de ratas con insuficiencia renal sobrecargadas con aluminio por vía intraperitoneal, así como un aumento del grado de hemólisis. Estos autores sugirieron un mecanismo de hemólisis intravascular semejante al que ocurre en la talasemia: la mayor rigidez de la membrana dificultaría la circulación de los eritrocitos a través de los pequeños vasos, estando por lo tanto, favorecida la lisis celular. Se postula, entonces, que el aluminio interactuaría con componentes de la membrana de los glóbulos rojos maduros en el torrente sanguíneo provocando modificaciones en la flexibilidad, permeabilidad y formación de lipoperóxidos, induciendo un aumento de la hemólisis intravascular.

Dado que el ARN del reticulocito desaparece poco después del ingreso de esta célula a la sangre, el recuento de reticulocitos sirve como medida del número de células que la médula ósea libera hacia la circulación. Por lo tanto, resulta una prueba muy útil en la evaluación inicial de un cuadro hemolítico, ya que aumenta, paralelamente, con la capacidad de respuesta eritropoyética de la médula ósea. El aumento del porcentaje de reticulocitos, observado en los frotis de sangre de las ratas que ingirieron aluminio

(Tabla I.1), refleja la respuesta de la médula ósea para intentar compensar la disminución del volumen globular. A pesar de ser estadísticamente significativo, ese aumento no alcanza para lograr una respuesta compensatoria. Esto sugiere una depresión de la funcionalidad de la médula ósea.

Efectivamente, en este estudio, la ingestión prolongada de citrato de aluminio durante ocho meses provocó una disminución significativa en el desarrollo de colonias eritroides, cultivadas *ex vivo* (Fig. I.3). Se sabe que el estado fisiológico de la eritropoyesis *in vivo* se refleja en el desarrollo de las CFU-E *in vitro* (Udupa y Lipschitz, 1986), y que la eritropoyetina induce proliferación y diferenciación de CFU-E. Se interpreta entonces, que la sobrecarga oral de aluminio ha provocado *in vivo* un efecto tal que la célula ya no puede completar su ciclo de desarrollo normal cuando es estimulada *in vitro* con eritropoyetina. Por otra parte, en base a estos resultados se podría proponer al desarrollo de CFU-E *in vitro* como «marcador tóxico de efecto», ya que la inhibición significativa de la respuesta de CFU-E a la eritropoyetina aparece como un signo constante en la intoxicación con aluminio. Esta inhibición ya había sido observada en ratas con insuficiencia renal (Nesse *et al*, 1997) y en ratas y ratones con función renal normal (Garbossa *et al*, 1996; Nesse *et al*, 1997; Garbossa *et al*, 1998a) expuestos a aluminio. En el mismo sentido, fue reportada una disminución gradual del número de proeritroblastos y eritroblastos basófilos, policromatófilos y ortocromáticos durante el período de ochenta días de implantación de un alambre de aluminio en la médula ósea de ratas (Zaman *et al*, 1990).

¿Cuáles serían los mecanismos por cuales el aluminio induce los efectos observados en las células eritroides?

La inhibición de la absorción intestinal de hierro por la presencia de aluminio (Han *et al*, 2000) podría haber provocado, durante el prolongado período de tratamiento, una deficiencia de hierro, metal esencial para la síntesis de hemoglobina en las células eritroides. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de hierro y transferrina, similares a las de las ratas controles (Tabla I.3), muestran que los animales no tenían deficiencia de hierro.

Pero ¿Es la célula capaz de captar el hierro necesario?

Dado que la transferrina puede transportar tanto hierro como aluminio hacia los tejidos, la presencia de aluminio unido a transferrina, compite con el hierro ligado a la misma proteína por su interacción con los receptores de superficie, afectando, de esta manera, la incorporación de hierro a la célula (Pérez *et al*, 1999). Cuando se evaluó que esta posibilidad hubiera ocurrido en las células progenitoras eritroides durante la

experiencia de exposición a aluminio *in vivo*, se encontró un aumento de sideroblastos en los extendidos de médula ósea de los animales sobrecargados con aluminio. Además, se demostró que presentaban importantes depósitos intracelulares de hierro, ya que algunos sideroblastos contenían numerosos gránulos dispuestos en forma de anillo (Fig. I.4). Estas observaciones muestran que las células provenientes de los animales tratados con aluminio son capaces de captar hierro, pero también sugieren que el hierro no es eficientemente utilizado. El prolongado período de ingestión de aluminio a que fueron sometidas las ratas habría permitido una adaptación celular para adecuar el contenido intracelular de hierro. Esta hipótesis es apoyada por otros trabajos de nuestro laboratorio en los que se demostró que células de la línea eritroleucémica K562 sufren regulación positiva de la vía independiente de transferrina para captar hierro (Pérez *et al*, 2002).

El hallazgo de sideroblastos junto con la inhibición del desarrollo de CFU-E indicarían que las células progenitoras no pueden utilizar en forma normal el hierro que incorporan. Ya ha sido descrita esta situación paradójica de un estado de “deficiencia de hierro” a pesar de la abundancia del hierro total (Bommer *et al*, 1983). Los autores detectaron consistentes depósitos de hierro y aluminio dentro de lisosomas de macrófagos, analizados en material de tejidos post-mortem de pacientes que habían recibido compuestos de aluminio por vía oral, y propusieron que la interferencia de aluminio con hierro se basaría en la co-precipitación de ambos iones trivalentes.

Dado que en los ensayos *ex vivo* las células progenitoras son aisladas del medio con aluminio y son estimuladas con eritropoyetina, se sugiere que la inhibición de su crecimiento de CFU-E podría deberse a un bloqueo en la respuesta celular a la hormona.

Con respecto a la acción del aluminio sobre los glóbulos rojos, se investigó la posibilidad de una asociación entre las alteraciones morfológicas y la presencia intracelular de aluminio. La combinación de microscopía electrónica de barrido con análisis de energía dispersada de rayos X (EDAX) permite distinguir la composición química intracelular. El aporte más valioso de esta técnica de análisis consistió en la localización de aluminio en los eritrocitos con anomalías morfológicas de los animales tratados (Fig. I.6 y I.7) pero no en aquéllos que conservaban intacta la apariencia bicóncava propia de los glóbulos rojos normales, ya provinieran de ratas controles (Fig. I.9) o de animales expuestos a aluminio (Fig. I.8).

¿Cómo puede explicarse que, ante una disminución tan importante del desarrollo de

CFU-E, no se hubiera producido un descenso mayor en el volumen globular?

Las CFU-E existen *in vivo* en todas las fases del ciclo celular, cuya duración ha sido estimada en 7-11 horas (Lajtha *et al*, 1971; Kennedy *et al*, 1978; Udupa y Lipschitz, 1986). La eritropoyetina en cultivos *in vitro* estimula a estas células en todas las fases del ciclo. El número absoluto de células estimuladas depende de la concentración de eritropoyetina (Udupa y Lipschitz, 1986) pero las CFU-E en fase G₁ son menos sensibles al estímulo de la hormona (Monette *et al*, 1980). Por otra parte, las células en G₁ o G₀ requieren un período de ocho horas de exposición previa a la eritropoyetina para que la célula progrese en el ciclo hasta las fases S y G₂. Este período de demora no puede ser acortado por aumento de la dosis de eritropoyetina en el medio (Udupa y Lipschitz, 1986). Se postula una hipótesis desarrollada en base a estas observaciones para interpretar los resultados obtenidos, por la cual, la disminución del desarrollo de CFU-E se debería, al menos en parte, a la acción del aluminio sobre las células. El efecto del metal mantendría un mayor número de células en fase G₁ o G₀ y prolongaría la duración del ciclo celular. Apoyando esta hipótesis, algunos trabajos han mostrado efectos del aluminio sobre el ciclo celular (Quarles *et al*, 1991; Guo & Liang, 2001). Por otra parte, si bien el método de cultivo de progenitores eritroides permite estimar el estado fisiológico de la eritropoyesis *in vivo*, algunas diferencias entre ambos sistemas podrían amplificar *in vitro* el efecto previo ocasionado por el aluminio. En los animales sobrecargados con aluminio, las CFU-E en la médula ósea del animal intacto serían condicionadas por la presencia de eritropoyetina y de otros factores de crecimiento endógenos en forma continua. Esto podría explicar la aparición de moderados signos de anemia a pesar de los efectos deletéreos del aluminio.

Los datos mostrados en este capítulo aportan evidencias de que el aluminio constituye un elemento tóxico para las células eritroides, en particular, cuando la acumulación intracelular está favorecida. La causa principal de esta acción tóxica no es la deficiencia de hierro, sino más bien algún defecto en la utilización de este metal esencial o una alteración de la célula progenitora que conduce a la disminución de su respuesta a eritropoyetina.

Del mismo modo que en las anemias de desórdenes crónicos, los efectos de la ingesta de aluminio serían el resultado de una modesta destrucción de los eritrocitos a la cual se sumaría la incapacidad de la médula ósea para aumentar la producción de glóbulos rojos.

CAPÍTULO II

ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE CÉLULAS ERITROIDES MADURAS

Los cambios morfológicos encontrados en glóbulos rojos de ratas, crónicamente expuestas a soluciones de Al, condujeron a las siguientes preguntas: ¿El efecto debido a la exposición a Al puede demostrarse también en eritrocitos maduros humanos? De ser así ¿existe una acción directa del metal sobre las células ya maduras en circulación o las células progenitoras eritroides afectadas por Al son responsables de generar eritrocitos con formas alteradas ?

Para contestar estas preguntas y analizar específicamente una probable acción directa del metal sobre células eritroides maduras, se diseñaron experiencias de exposición a Al *in vitro*.

MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO

Con el fin de evaluar un efecto directo *in vitro* del Al sobre la morfología eritrocitaria se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB).

Eritrocitos humanos fueron incubados en medio conteniendo citrato de Al 100 μM . Como controles de envejecimiento se incubaron eritrocitos en ausencia del metal con y sin citrato de sodio 100 μM .

La serie de microfotografías en el presente capítulo (Fig. II.1, II.2, II.3) es representativa de los numerosos campos analizados en las muestras correspondientes a cuatro individuos.

Las Figuras II.1.a, II.2.a, II.3.a muestran que el proceso de envejecimiento prácticamente no alteró la forma eritrocitaria. Excepto por algunas células crenadas (Fig. II.2.a), los glóbulos rojos de las muestras incubadas en ausencia de Al no mostraron alteraciones. El aspecto de los preparados fue semejante al de los realizados con las mismas muestras al momento de la extracción. Las muestras envejecidas en presencia de citrato de Na tampoco mostraron alteraciones morfológicas de los eritrocitos. Contrariamente, en los preparados que contenían células incubadas con el

metal desaparecieron los eritrocitos con la forma típica bicóncava dando lugar a la aparición de numerosos cambios morfológicos (Fig. II.1, II.2, II.3.b-d). Dentro de las alteraciones más frecuentes se observaron acantocitos y estomatocitos. Los primeros son células espiculadas (Fig. II.1.b y c, II.2.d, II.3.b y d). Los estomatocitos son células en forma de copa, con una cavidad muy pronunciada (Fig. II.1.d, II.2.c, II.3.c). También se observaron células sin forma típica conocida, presentando invaginaciones múltiples (Fig. II.1.b, II.2.b), además de encontrarse, raramente, células planas o leptocitos (Fig. II.1.b).

La morfología normal de eritrocitos humanos circulantes se ve alterada cuando se somete a estas células a un proceso de envejecimiento in vitro en presencia de compuestos de Al.

ESTRUCTURA DE ERITROCITOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO

Con el fin de estudiar posibles cambios estructurales de los eritrocitos humanos incubados en presencia de compuestos de Al se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET).

En las microfotografías expuestas en la Figura II.4 se muestran campos representativos de los observados en todas las muestras de glóbulos rojos estudiadas.

Si bien por MET no se observan las características morfológicas con la precisión de la técnica de MEB, igualmente pudieron detectarse formas atípicas tales como estomatocitos y acantocitos, en los preparados de eritrocitos tratados con Al (Fig. II.4.b y d). La observación en detalle de la membrana de glóbulos rojos incubados con Al (Fig. II.4.f), reveló un aspecto difuso y menos denso que el de las membranas de los eritrocitos controles (Fig. II.4.e).

En los preparados de eritrocitos incubados con compuestos de aluminio no sólo se detectan células con formas atípicas, sino también modificaciones en la membrana celular.

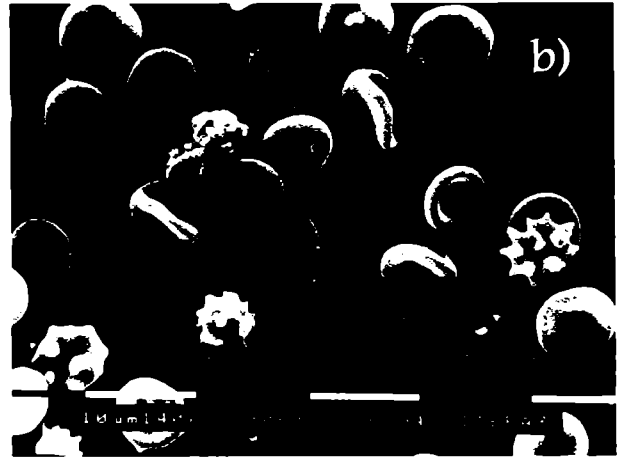
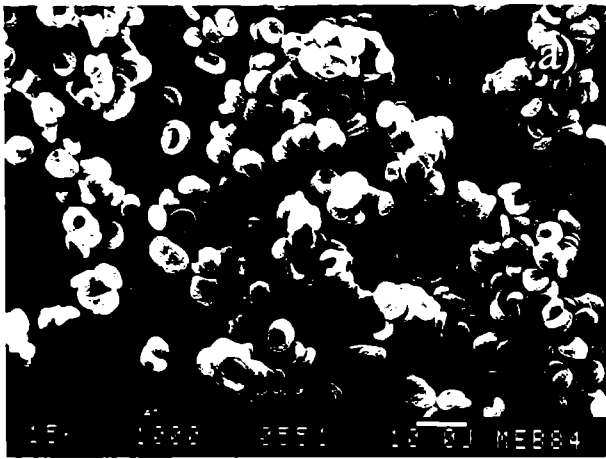


Figura II.1

Morfología de eritrocitos humanos incubados *in vitro* en presencia de aluminio

Morfología de eritrocitos de individuos sanos incubados 14 días, en ausencia (a) y en presencia (b-d) de citrato de Al 100 μM .

a) Morfología normal (1000x); b) Presencia de leptocitos y acantocitos, además de células con morfologías atípicas (2300x); c) Acantocitos (2400x); d) Estomatocitos (5400x).

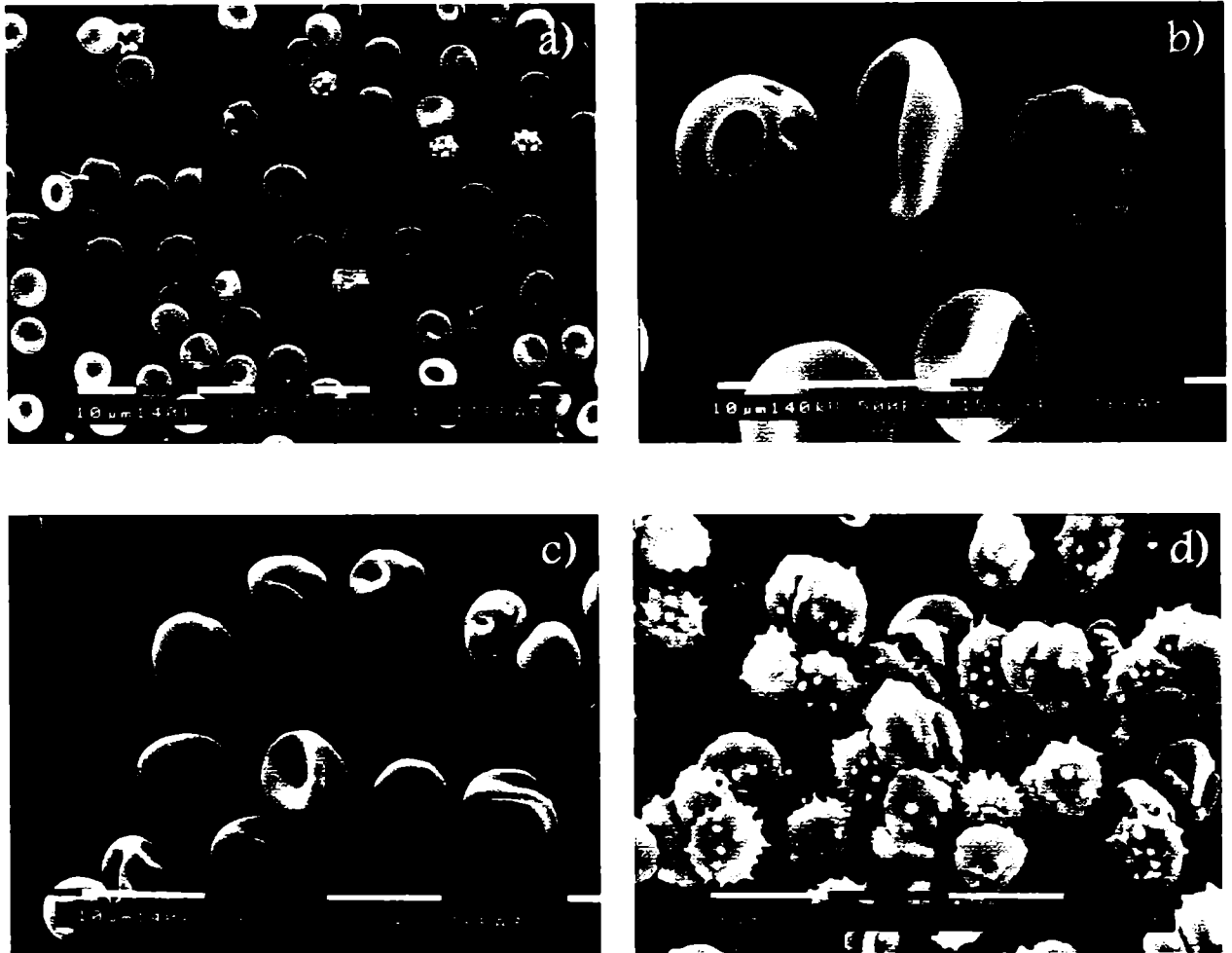


Figura II.2

Morfología de eritrocitos humanos incubados *in vitro* en presencia de aluminio

Morfología de eritrocitos de individuos sanos incubados 14 días, en ausencia (a) y en presencia (b-d) de citrato de Al 100 μ M.

a) Morfología normal (1200x); b) Presencia de células con más de dos cavidades y células con protuberancias alargadas (5000x); c) Estomatocitos y formas anómalas (2620x); d) Presencia de acantocitos (2500x).

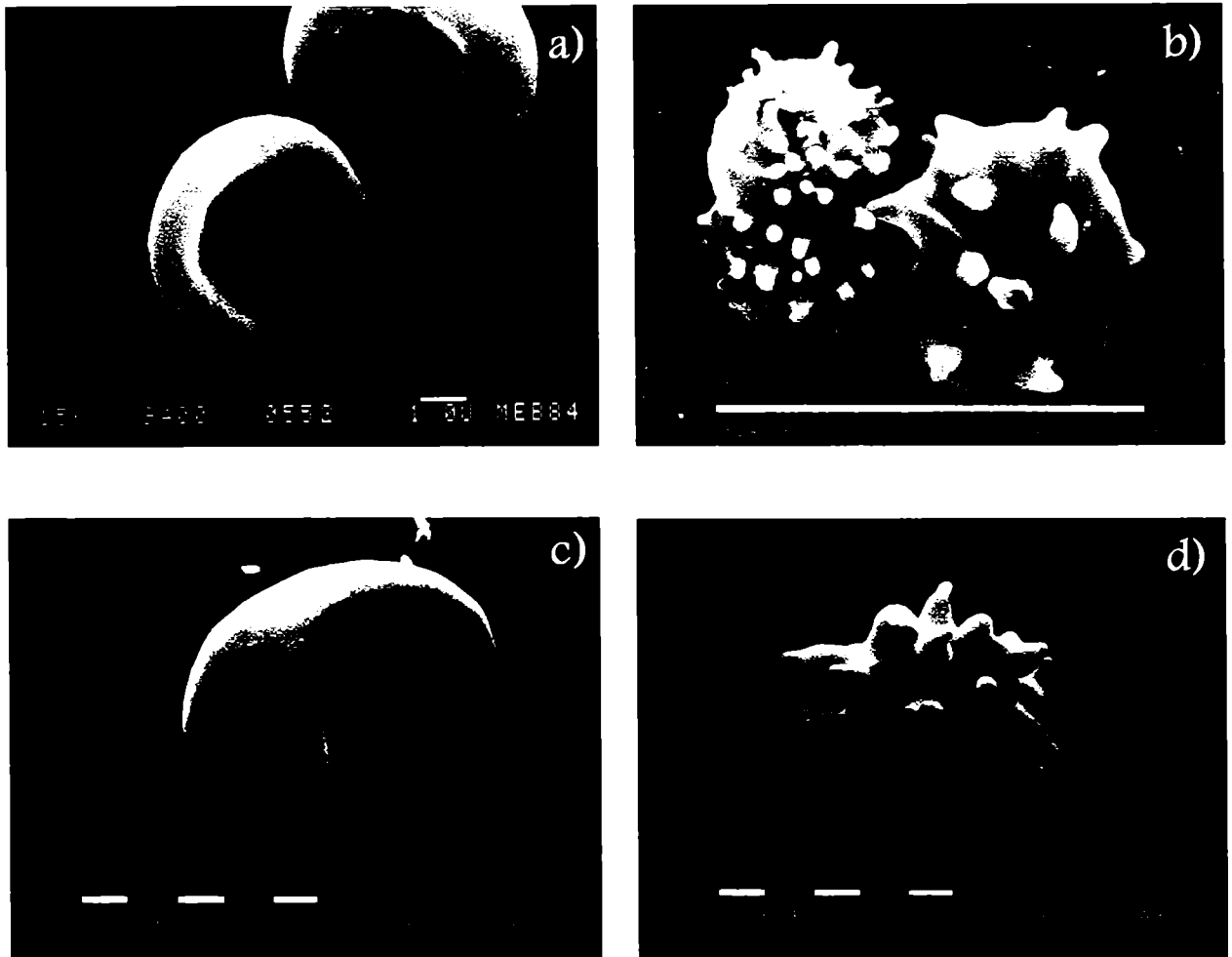


Figura II.3

Morfología de eritrocitos humanos incubados *in vitro* en presencia de aluminio

Morfología de eritrocitos de individuos sanos incubados 14 días, en ausencia (a) y en presencia (b-d) de citrato de Al 100 μ M.

a) Morfología normal (9400x); b) Acanthocitos (9150x); c) Estomatocito (10000x); d) Acanthocito (10000x).

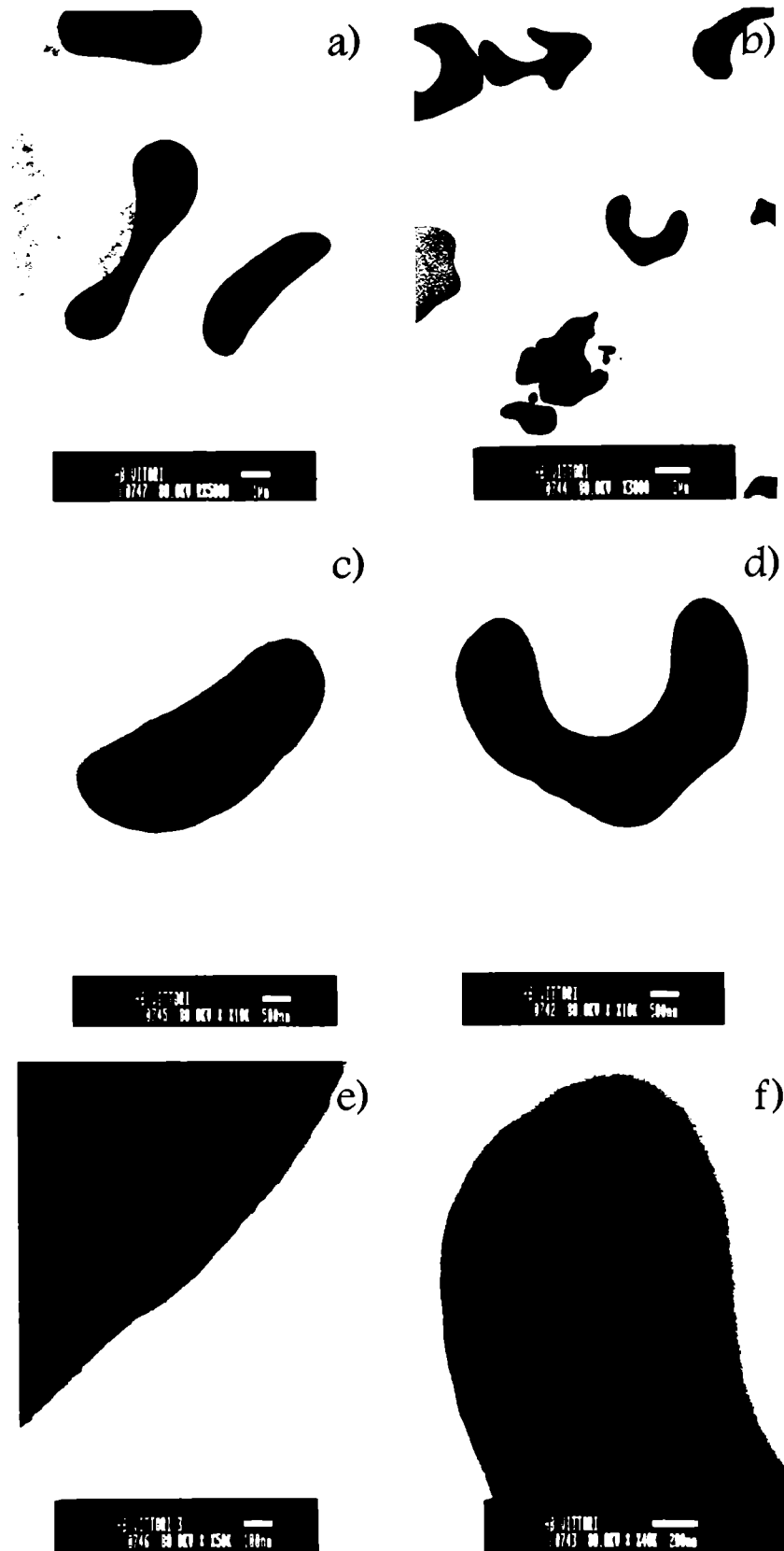


Figura.II.4

Estructura de eritrocitos humanos incubados *in vitro* en presencia de aluminio

Microfotografías electrónicas de eritrocitos de individuos sanos incubados 14 días, en ausencia (a,c,e) y en presencia (b,d,f) de citrato de Al 100 μ M.

a y c) Eritrocitos normales, magnificación x5K (a), x10K (c). b y d) Eritrocitos incubados con Al, magnificación x3K (b), x10K (d). e) Detalle de membrana de eritrocito normal (x50K). f) Detalle de membrana de eritrocito incubado con Al (x40K).

PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE GLÓBULOS ROJOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO

Los cambios morfológicos encontrados en los eritrocitos envejecidos en presencia de Al sugirieron la existencia de alteraciones de algún componente de la membrana celular. Por ello, se estudió la composición proteica de la membrana eritrocitaria de fantasmas de glóbulos rojos que habían sido incubados previamente durante distintos períodos con compuestos de Al.

Perfil proteico por electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizaron ensayos de eritrocitos envejecidos en presencia de Al 10 ó 100 μM agregados en forma de citrato o cloruro durante distintos períodos.

Los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana, analizados por SDS-PAGE y visualizados por doble tinción con plata y azul brillante de Coomassie, fueron similares, independientemente de que los eritrocitos hubieran sido o no tratados con Al (Fig. II.5). En la figura se detallan las proteínas mayoritarias y su masa molecular relativa aproximada.

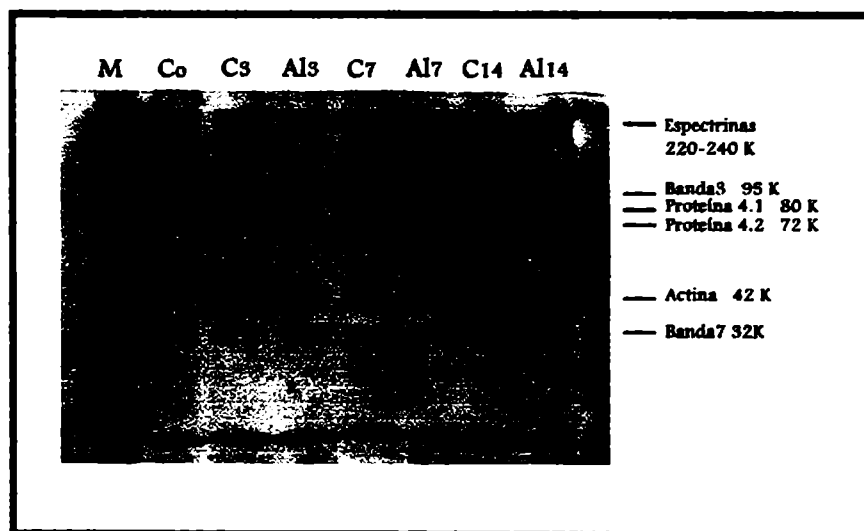


Figura II.5

SDS-PAGE de las proteínas de membrana de eritrocitos humanos incubados con aluminio

Las proteínas de los fantasmas de eritrocitos frescos (Co), incubados por 3 (C3), 7 (C7) o 14 (C14) días y eritrocitos incubados en presencia de 100 μM de cloruro de Al por 3 (Al3), 7 (Al7) o 14 (Al14) días, fueron analizadas por SDS-PAGE (T=8%) y reveladas por doble tinción con plata y azul brillante de Coomassie. Se muestra la posición de las proteínas mayoritarias de la membrana junto con su M_r . El perfil es representativo de 7 ensayos.

Detección de banda 3 y espectrina por *Western blot*

Se ha postulado a la banda 3 como una proteína indispensable para mantener la estabilidad de la membrana plasmática debido a su interacción con los lípidos de la bicapa. Además, se ha remarcado que alteraciones en los niveles y en la estructura molecular efectiva de las proteínas que integran la membrana, pueden cambiar el equilibrio de las formas discoides hacia formas no axisimétricas (Hägerstrand *et al*, 1999).

Debido a estos antecedentes se estudiaron proteínas de membrana de eritrocitos incubados durante diferentes períodos con Al, analizando su expresión por electroforesis y *western blot*.

La Figura II.6 muestra los *immunoblots* característicos de la proteína banda 3 de membrana de eritrocitos controles o tratados con Al durante diferentes períodos. Las membranas fueron reveladas con anticuerpo anti-banda 3. En la calle C₀ se observa el perfil de bandas obtenido de fantasmas de glóbulos rojos sin incubación previa. El anticuerpo reconoce, según las especificaciones comerciales, la proteína banda 3 de masa molecular relativa $M_r \approx 95$ K y varios péptidos de menor M_r , que migran en regiones de $M_r \approx 60$ K; 40 K y 20 K.

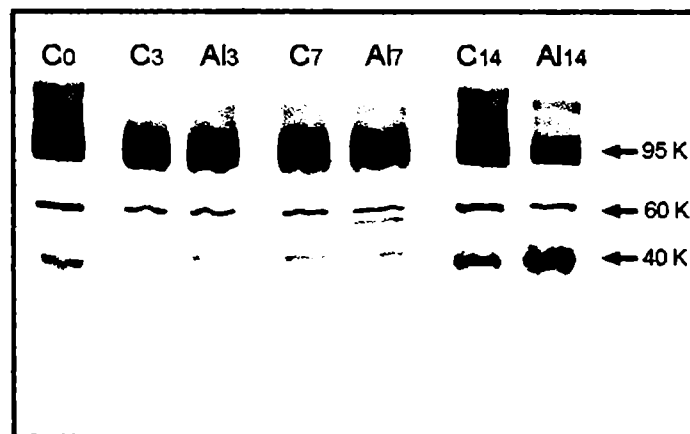


Figura II.6

***Immunoblots* de proteína banda 3 de eritrocitos tratados con aluminio.**

Proteínas de membrana de eritrocitos humanos (5 µg) fueron analizadas por SDS-PAGE e immunoblotting. Las proteínas de los fantasmas fueron obtenidas de eritrocitos frescos (C₀), o incubados por 3 (C₃), 7 (C₇) o 14 (C₁₄) días y eritrocitos incubados en presencia de citrato o cloruro de Al 100 µM por 3 (Al₃), 7 (Al₇) o 14 (Al₁₄) días. La proteína fue detectada por reacción con anticuerpo monoclonal anti-banda 3 humana y posteriormente con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina, para finalmente ser revelada con sustrato cromogénico. El perfil mostrado es representativo de los ensayos realizados con citrato o cloruro de Al (n=6).

El análisis de los *immunoblots* reveló perfiles alterados de la proteína de membrana banda 3 como consecuencia del envejecimiento de los eritrocitos humanos en medio rico en Al (Fig.II.6). En los *immunoblots* correspondientes a estas muestras se observa un aumento del fragmento ≈ 57 K a los 7 días, mientras que a los 14 días, esta banda desaparece y se observa un incremento importante del fragmento de 40 K. El perfil de degradación de banda 3 se completa con una disminución gradual de la molécula completa (fracción 95 K).

Los resultados fueron independientes del compuesto de Al (citrato o cloruro) utilizado durante el envejecimiento de los glóbulos rojos. El mismo perfil de degradación, pero de menor magnitud, fue observado después de la incubación prolongada (14 días) de eritrocitos con compuestos de Al 10 μ M.

Cuando se estudió el perfil electroforético de la proteína espectrina por *immunoblotting*, empleando el anticuerpo específico, no se encontraron diferencias entre las muestras de eritrocitos incubados en presencia o ausencia de Al.

La exposición de eritrocitos a aluminio provoca degradación de la proteína banda 3 localizada en la membrana eritrocitaria. El incremento de este efecto tóxico se manifiesta, principalmente, a los 14 días de incubación, aunque parecería existir una relación con el tiempo de exposición al metal.

FRAGILIDAD OSMÓTICA Y VISCOSIDAD DE ERITROCITOS ENVEJECIDOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO

Se estudiaron la fragilidad osmótica y el parámetro hemorreológico de viscosidad de la membrana plasmática, para analizar si las alteraciones morfológicas observadas en los eritrocitos expuestos a Al, se relacionaban con cambios en estos parámetros. Estos ensayos fueron realizados con eritrocitos envejecidos durante 7 y 14 días en presencia de citrato de Al 100 μ M. Después del periodo de envejecimiento una suspensión de eritrocitos fue analizada en un viscosímetro rotacional. La viscosidad de membrana (η) no fue alterada por la exposición de los eritrocitos a Al. Los valores obtenidos a máxima velocidad de corte (230 s^{-1}), expresados como Media \pm SEM, fueron $2,5 \pm 0,04$ mPa.s para los eritrocitos incubados en ausencia de Al y $2,5 \pm 0,07$ mPa.s para los eritrocitos tratados con el metal tomados en conjunto los datos de incubaciones durante 7 y 14 días. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre

ambas muestras (n=5).

Para estudiar el efecto del Al sobre la resistencia de eritrocitos a un medio de osmolaridad variable, se utilizó la prueba de fragilidad osmótica. Los valores de porcentaje de hemólisis fueron calculados a partir de los datos de absorbancia a 540 nm y graficados en función de las concentraciones molares de las soluciones hemolizantes de cloruro de sodio. A partir de las curvas, se calcularon los valores de "fragilidad corpuscular media" (FCM), los que corresponden a la concentración molar de solución hemolizante a la cual se produce el 50% de hemólisis de la suspensión eritrocitaria.

Los valores de FCM expresados como Media \pm SEM fueron $73,6 \pm 2,22$ mM para el control y $73,5 \pm 1,00$ mM para los eritrocitos incubados con Al. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Con el fin de analizar la existencia de cambios en la relación superficie/volumen celular, se determinó el volumen corpuscular medio (VCM) de los eritrocitos. El VCM de los eritrocitos incubados con Al ($105 \pm 2,5$ fl/cél.; Media \pm SEM; n=7) fue similar al de las células envejecidas en ausencia de Al ($100 \pm 4,1$ fl/cél.; Media \pm SEM; n=7).

Los parámetros de viscosidad de membrana, fragilidad osmótica y volumen corpuscular medio de los eritrocitos no parecen ser afectados por la incubación in vitro en presencia de aluminio.

CONTENIDO DE ALUMINIO EN ERITROCITOS ENVEJECIDOS *IN VITRO*

En los estudios *in vivo* se encontró acumulación de Al en el organismo de los animales luego de una intoxicación prolongada (Capítulo I). Los análisis por EDAX mostraron que el Al estaba presente en esquistocitos y células crenadas, no así en eritrocitos con formas alteradas de animales controles o en eritrocitos con morfología normal (Capítulo I). En base a estas observaciones se determinó el contenido de Al en membrana y citosol de glóbulos rojos incubados *in vitro* con el metal, para dilucidar si éste era capaz de penetrar en las células y estudiar su distribución dentro del eritrocito. Dicha cuantificación se realizó por espectrometría de absorción atómica en glóbulos rojos incubados durante dos diferentes períodos y con dos concentraciones de Al (Fig. II.7).

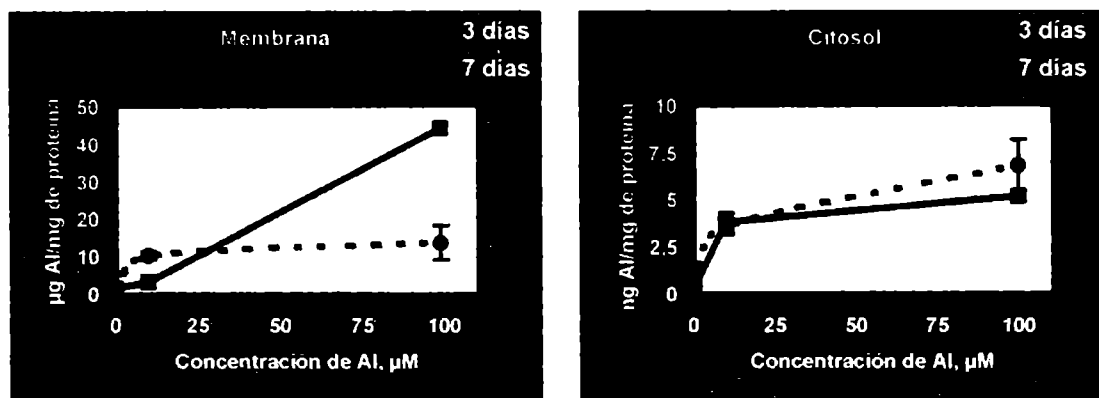


Figura II.7

Contenido de aluminio en membrana y citosol del eritrocito

Glóbulos rojos humanos fueron envejecidos sin Al o en presencia de citrato de Al 10 o 100 µM por 3 o 7 días. Los contenidos de Al fueron medidos luego de la lisis del eritrocito en las fracciones de membrana y citosol. Cada punto representa la Media ± SEM (n=3). El contenido de Al detectado en la membrana luego de 7 días de incubación con Al 100 µM es significativamente diferente ($P < 0,01$) con respecto a los resultados encontrados por incubación con bajas dosis o con altas dosis por 3 días (Prueba de Welch). El valor de $x=0$ en las abscisas corresponde al contenido de Al en las fracciones controles, las cuales fueron incubadas durante el mismo periodo sin agregado de Al.

El Al penetra a la célula, ya que se encontró en la fracción citosólica (Fig. II.7.b). Sin embargo, no se observaron variaciones en el contenido de Al intracelular como consecuencia del tiempo de exposición, ni de las dosis empleadas (Fig. II.7.b). Por el contrario, cantidades elevadas de Al asociado a la membrana fueron detectadas luego de 7 días de incubación con Al 100 µM (Fig. II.7.a). Este resultado fue significativamente diferente de los resultados observados con bajas dosis de Al (10 µM) a los 3 y 7 días, y con altas dosis (100 µM) durante períodos cortos de incubación (3 días) (Fig. II.7.a).

Los resultados son coherentes con el hallazgo de la degradación de banda 3 observado por exposición a concentraciones elevadas de Al.

El aluminio presente en el medio de incubación puede ser incorporado al interior del glóbulo rojo. Cuando el metal está en contacto con la célula por periodos prolongados es capaz de anclarse en la membrana.

DISCUSIÓN

Ya en 1929 Seibert & Wells observaron anomalías morfológicas en eritrocitos de conejos que habían sido expuestos a aluminio. Resultados similares fueron obtenidos, en el presente trabajo, en ratas que ingirieron aluminio en el agua de bebida (Capítulo I). Los ensayos *in vivo* no permitieron discriminar si la alteración de forma de los eritrocitos se debía a su circulación en el plasma rico en aluminio o si habían sido consecuencia de originarse a partir de células progenitoras alteradas. Los resultados de los experimentos *in vitro* con eritrocitos humanos en este capítulo corroboraron que el aluminio ejerce, al menos, una acción directa sobre estas células. La observación de la morfología celular, por MEB (Fig. II. 1-3) y MET (Fig. II. 4), demostró una transformación de la forma típica bicóncava de los eritrocitos envejecidos *in vitro* a formas anómalas (acantocitos y estomatocitos), debido a la presencia de compuestos de aluminio en el medio de cultivo.

Según la “hipótesis de la bicapa asociada” propuesta por Sheets & Singer (1974), la membrana forma una superficie cerrada en la cual las proteínas y lípidos involucrados están distribuidos asimétricamente en las dos mitades de la bicapa. Así, las dos mitades de la membrana pueden responder de manera diferente a distintas perturbaciones mientras que se mantienen asociadas. Para explicar las modificaciones morfológicas de eritrocitos debidas a su interacción con determinados compuestos, postularon que la acumulación diferencial de esos compuestos en la mitad externa conlleva a la formación de formas espiculadas (acantocitos o equinocitos), mientras que su acumulación en la mitad citoplasmática provoca la conversión a formas en copa (estomatocitos) (Fig. II.8).

El hecho de que los compuestos de aluminio hayan inducido simultáneamente la formación de acantocitos y estomatocitos (Fig. II.1-4) indicaría que el metal podría interactuar en ambas mitades de la monocapa, la externa y la citoplasmática. Hallazgos recientes utilizando modelos moleculares de biomembranas apoyan esta suposición (Suwalsky *et al*, 1999). Estos modelos, construidos en multicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), representan las clases de fosfolípidos localizados en las monocapas interna y externa respectivamente, de la membrana del eritrocito humano. El análisis de difracción de rayos X de las capas DMPC y DMPE, mostró que el acetilacetato de Al -un compuesto neutro, hidrolíticamente estable y lipofílico - podía insertarse en ambas

bicapas. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando se ensayaron soluciones acuosas de cloruro de aluminio (Suwalsky *et al*, 2001) o del complejo de citrato de aluminio (Suwalsky *et al*, 2002).

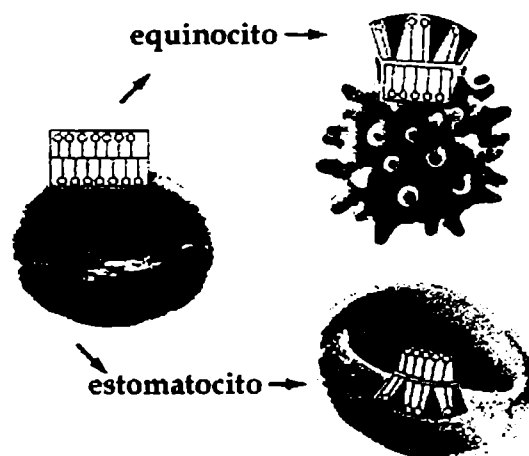


Figura II.8

Esquema de la acumulación diferencial de compuestos en la membrana del eritrocito
Adaptado de Palek & Jarolim, 1993.

A pesar de que, en el presente trabajo, no pudo ser establecida una localización específica del aluminio en alguna de las dos mitades de la bicapa, está claro que el metal entra en la célula y, en elevadas cantidades, se ancla en la membrana (Fig. II.7). Esta observación apoya fuertemente la hipótesis de que los iones aluminio son capaces de unirse a fosfolípidos vecinos en la bicapa, creando espacios dentro de la membrana con el subsecuente re-arreglo (Van Rensburg *et al*, 1995). Se puede sugerir, entonces, que el Al se uniría inespecíficamente a los fosfolípidos, y según la interacción predominante del metal con alguna de las dos hemicapas induciría el cambio morfológico correspondiente.

Además de la acumulación mencionada, otra característica importante que puede afectar la forma y la estabilidad de la membrana del eritrocito, es el carácter de las interacciones entre la membrana y el citoesqueleto (Tanner, 1993). En este contexto, los resultados de este capítulo muestran que el aluminio induce cambios en las proteínas de membrana. Aunque no se observó un perfil alterado de las proteínas totales (Fig. II.5), un análisis más específico mostró que el envejecimiento de eritrocitos en presencia de aluminio inducía un patrón alterado de proteínas de membrana, compatible con la degradación de la proteína banda 3 (Fig. II.6). El hecho de que se produjera una disminución de la concentración de la molécula completa de

proteína banda 3 y un concomitante incremento de la concentración de fragmentos de menor M_r , parecería estar relacionado con la duración de la exposición a aluminio. Pudo detectarse que las M_r de los fragmentos de degradación (Fig. II.6) son coincidentes con los lugares de corte y los fragmentos resultantes luego de la proteólisis de banda 3, descritos por Morrison y colaboradores (1985), que se presentan en la Figura II.9. Los autores han propuesto que el péptido de 60 K sería un producto de corte en algún sitio justo fuera de la bicapa, ya que este fragmento atraviesa la membrana plasmática. El otro sitio de corte se produciría en la cara interna de la bicapa, generándose el péptido de 40 K. Sugirieron, además, que el dominio citoplasmático de la proteína banda 3 interactuaría con otras proteínas de membrana, y ésta sería una razón suficiente para que los fragmentos queden unidos a la misma. Esto impide la pérdida de los fragmentos citoplasmáticos de la proteína durante el proceso de obtención de los fantasmas eritrocíticos y, así, pueden ser detectados por fraccionamiento electroforético.

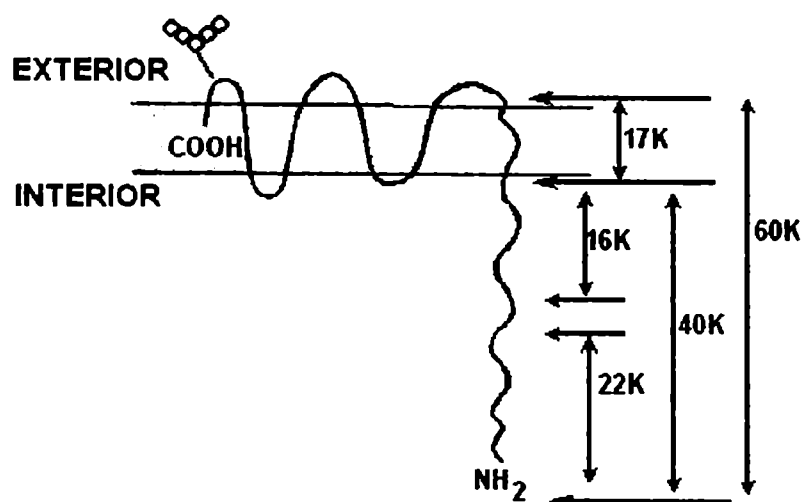


Figura II.9

Esquema de los fragmentos resultantes por proteólisis de Banda 3
Adaptado de Morrison et al, 1985.

Como ya se ha mencionado, la proteína banda 3 es la principal proteína integral que une la membrana plasmática con el esqueleto. Teniendo en cuenta este hecho, la disminución de banda 3, como consecuencia de su degradación, podría resultar en una interacción débil entre la membrana plasmática y el esqueleto y, de esta forma, explicar las alteraciones morfológicas de los eritrocitos expuestos a aluminio. Apoyando esta sugerencia, se ha encontrado que el eritrocito del vertebrado primitivo

lamprea posee una forma de tipo estomatocítica. Llamativamente, el glóbulo rojo de esta especie carece de proteína banda 3 en su membrana (Hägerstrand *et al*, 1999). Las formas no discoides de esos eritrocitos son adjudicadas a una deficiencia en las interacciones entre la bicapa y el esqueleto, debido a una distribución lateral no uniforme de las proteínas de membrana por ausencia de la proteína banda 3.

Un apoyo adicional a la suposición de que la deficiencia de proteína banda 3 afecta la forma celular, surge de un estudio en el que se muestra que eritrocitos bovinos con deficiencia completa de banda 3, tienen una forma poliinvaginada (Inaba *et al*, 1996) similar a la de algunos glóbulos rojos encontrados por MEB en el presente trabajo (Fig. II.1-3).

Como fue mencionado en la Introducción, los roles de los componentes estructurales de la membrana del glóbulo rojo están bien delineados: la bicapa lipídica junto con las proteínas transmembrana aíslan químicamente y regulan el interior de la célula, mientras que la red del esqueleto provee un soporte rígido para aumentar la estabilidad.

La deformabilidad de la membrana es uno de los componentes que regula la deformabilidad del eritrocito. A su vez, el coeficiente de viscosidad superficial se relaciona con el comportamiento de la membrana frente a la aplicación de una fuerza. Como el valor de este coeficiente para la membrana del glóbulo rojo normal es dos órdenes de magnitud más alto que el correspondiente a la capa lipídica aislada, se ha postulado que las proteínas del esqueleto tendrían un rol preponderante en la regulación del comportamiento viscoso de la membrana (Mohandas & Chasis, 1993).

La incubación previa de eritrocitos con aluminio no produjo cambios en la viscosidad de la membrana. Este resultado concuerda con el hecho de que la espectrina, principal proteína del esqueleto no constituyó un blanco para la acción del aluminio. Las modificaciones morfológicas podrían explicarse más bien por debilitación de las asociaciones proteína-proteína, en este caso, banda 3-espectrina, debido a la degradación de banda 3 inducida por aluminio.

La presencia de aluminio durante el proceso de envejecimiento *in vitro* de eritrocitos humanos no produjo cambios en su resistencia osmótica. Estos resultados indicarían que los cambios morfológicos no afectan en forma importante la relación superficie/volumen de los eritrocitos, característica que determina los cambios en la fragilidad celular frente a soluciones hemolizantes. De hecho, el volumen globular medio (VCM) no se modificó durante la inducción de las alteraciones morfológicas.

Estos resultados no coincidirían con los que demostraron un aumento de la resistencia osmótica de eritrocitos de animales expuestos a aluminio *in vivo* (Drueke *et al*, 1986b;

Garbossa *et al*, 1996; Garbossa *et al*, 1998a). Si bien las alteraciones morfológicas, causadas por la exposición a aluminio de eritrocitos humanos *in vitro* y de glóbulos rojos de rata *in vivo*, fueron similares, no se deriva, de ello, que los comportamientos sean semejantes, ya que los eritrocitos de los animales de experimentación recibieron dosis continuas del tóxico por períodos muy prolongados y se encontraban inmersos en un medio más complejo.

Por otra parte, se ha propuesto que la degradación de la proteína banda 3 juega un rol importante en la generación de la señal senescente en el eritrocito (Kay *et al*, 1989; Schwarz-Ben Meir *et al*, 1991; Bosman *et al*, 1991; Kosower, 1993), lo que conduciría a la perturbación de la superficie externa de la membrana vía cambios conformacionales, con la eliminación precoz de la célula como resultado final (Schwarz-Ben Meir *et al*, 1991). Teniendo en cuenta este hallazgo, podría sugerirse que el aluminio, que provoca degradación de la proteína banda 3, induciría un envejecimiento prematuro en las células que han estado en contacto con el metal. Una evidencia que apoya esta hipótesis es que se ha encontrado aumentada la actividad de calpaína, una enzima proteolítica que actúa sobre la banda 3, en cortes de cerebro de ratas expuestas a aluminio (Guo-Ross *et al*, 1998).

Se puede concluir que el aluminio interaccionaría con la bicapa lipídica, promoviendo la aparición de acantocitos y estomatocitos. La alteración simultánea de la estructura de la proteína banda 3 introduciría modificaciones en la distribución lateral de los componentes de membrana. Ello podría afectar el equilibrio de la forma del eritrocito, induciendo las anomalías morfológicas observadas.

La habilidad del aluminio de incorporarse a las células, modificar la configuración proteica de la membrana y alterar la morfología celular podría explicar algunos efectos del metal en su rol neuropatológico.

CAPÍTULO III

MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR A ERITROPOYETINA POR ACCIÓN DE ALUMINIO

La eritropoyetina (Epo) es la hormona responsable de regular la eritropoyesis, promoviendo la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de células progenitoras eritroides. Para cumplir esas funciones la Epo se une al receptor específico (EpoR) en la superficie celular. Esta unión inicia una cascada de señales de activación, que involucra procesos de fosforilación mediante los cuales se activan factores de transcripción específicos.

La observación de un efecto inhibitorio como consecuencia de una sobrecarga con Al sobre la respuesta de células progenitoras eritroides a la Epo (Capítulo I) permitió sugerir que el Al afecta la actividad de Epo mediada por su unión al receptor específico. Por ello, se evaluó la posibilidad de que el Al interaccionara con mecanismos involucrados en la vía de activación del EpoR.

Para cumplir este objetivo, se diseñaron experiencias empleando cultivos primarios de CFU-E humanas y cultivos de las líneas celulares humanas K562 y UT-7, que expresan receptores para Epo y han manifestado distinta dependencia de la hormona para desarrollarse.

ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE LA RESPUESTA A ERITROPOYETINA DE CÉLULAS PROGENITORAS ERITROIDES HUMANAS

Se investigó si células eritroides humanas eran afectadas por aluminio en forma similar a las células de m.o. de los animales expuestos crónicamente al metal.

Para evaluar este efecto, células progenitoras eritroides fueron semipurificadas a partir de sangre periférica de adultos sanos e incubadas en presencia de aluminio en cultivos estimulados con Epo.

El desarrollo de CFU-E, luego de 9 días de cultivo, se representa en la Figura III.1. Se observó una disminución significativa de 30% en el número de CFU-E, con respecto al control cuando las células progenitoras humanas fueron crecidas en presencia de Al.

Los datos, expresados como Media \pm SEM, indican que las células controles crecieron 12770 ± 500 CFU-E/ 10^6 cél., mientras que las tratadas con Al tuvieron un desarrollo significativamente menor, 8610 ± 910 CFU-E/ 10^6 cél ($P < 0,005$).

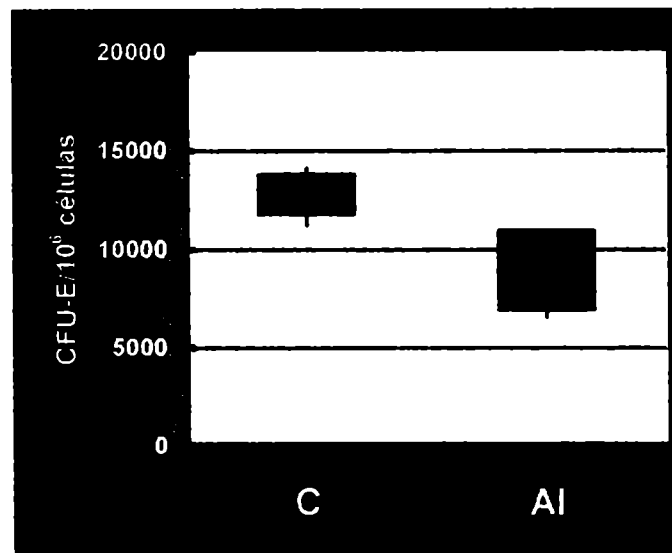


Figura III.1

Efecto del aluminio sobre la respuesta a eritropoyetina de células progenitoras eritroides humanas

Células progenitoras eritroides humanas ($3,5 \times 10^5$ /ml) semipurificadas a partir de sangre periférica de adultos sanos fueron estimuladas con 2 U Epo/ml, en presencia (Al) o ausencia (C) de citrato de Al $100 \mu\text{M}$ y cultivadas en medio semisólido, durante 9 días en atmósfera saturada con vapor de agua y CO_2 5% a 37°C . El número de colonias hemoglobinizadas fue determinado por la técnica de DAF. La disminución observada fue estadísticamente significativa ($P < 0,005$, $n=6$) con respecto al control (Prueba t de Student).

El desarrollo espontáneo de CFU-E determinado en cultivos sin Epo, expresado como Media \pm SEM, fue 5720 ± 620 CFU-E/ 10^6 cél. Este resultado fue estadísticamente significativo con respecto a las células estimuladas con la hormona (C, $P < 0,001$ y Al, $P < 0,05$; Prueba t de Student).

La disminución significativa del crecimiento de CFU-E humanas bajo el estímulo de Epo, desarrolladas en un medio rico en Al, concuerda con la inhibición de CFU-E detectada cuando fueron ensayadas *ex vivo* células de médula ósea pertenecientes a ratas con función renal normal que habían recibido una sobrecarga oral crónica de Al (Capítulo I).

El aluminio ejerce un efecto inhibitorio sobre la respuesta a eritropoyetina de células progenitoras eritroides de origen humano incubadas in vitro. Este efecto concuerda con el observado en ensayos ex vivo con células de médula ósea de animales de experimentación. La acción debida al contacto directo del aluminio con las células in vitro se manifiesta en el mismo sentido, aunque resulta de menor magnitud que la causada por el metal acumulado in vivo en el ámbito natural de la médula ósea.

ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE LA RESPUESTA A ERITROPOYETINA DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS

A partir de los resultados anteriores surgió el interés por investigar la posibilidad de que el Al interfiriera con mecanismos de activación celular mediados por Epo. Para ello, el modelo de CFU-E humanas, obtenidas de sangre periférica, resultaba inapropiado debido a la coexistencia de distintas poblaciones celulares. Por otra parte, existía la dificultad para obtener el número de células suficientemente purificadas, adecuado para desarrollar los ensayos y la imposibilidad de mantener los cultivos por períodos prolongados. Por esta razón, en los siguientes experimentos fueron empleadas las dos líneas celulares humanas, K562 y UT-7, descritas en Materiales y Métodos.

CRECIMIENTO CELULAR INDUCIDO POR ERITROPOYETINA

Con el fin de caracterizar los *subsets* de células K562 y UT-7, mantenidos en nuestro laboratorio, se evaluó el grado de dependencia de Epo. Para ello, el crecimiento celular fue analizado en ensayos dosis-respuesta. Las células de las dos líneas fueron cultivadas por 72 h para determinar su respuesta a Epo con relación a viabilidad, crecimiento (Fig. III.2) y diferenciación celular.

Se observó una elevada correlación entre la dosis de Epo y el número de células UT-7 viables, mientras que no se detectó una dependencia similar en los cultivos de células K562. La Figura III.2 muestra que el crecimiento celular observado en la línea UT-7 es sensible a las dosis de Epo, asociación claramente descrita por el coeficiente r de Pearson (0,83).

El efecto de Epo sobre la diferenciación celular eritroide fue evaluado por el nivel de desarrollo de células que presentan aumentada la síntesis de hemoglobina. Bajo las

condiciones empleadas, ni las células de la línea K562 ni las de la línea UT-7 fueron inducidas por Epo a diferenciarse hacia estadios celulares maduros. Los porcentajes de células hemoglobinizadas después de tres días de cultivo, como consecuencia de la estimulación con 2 U Epo/ml, con respecto a la hemogloblinización espontánea (sin agregado de Epo) fueron $9,7 \pm 2,2$ % vs. $8,9 \pm 1,1$ % para las células K562 y $6,1 \pm 1,7$ % vs. $5,8 \pm 1,0$ % para las células UT-7 (Media \pm SEM, n=5).

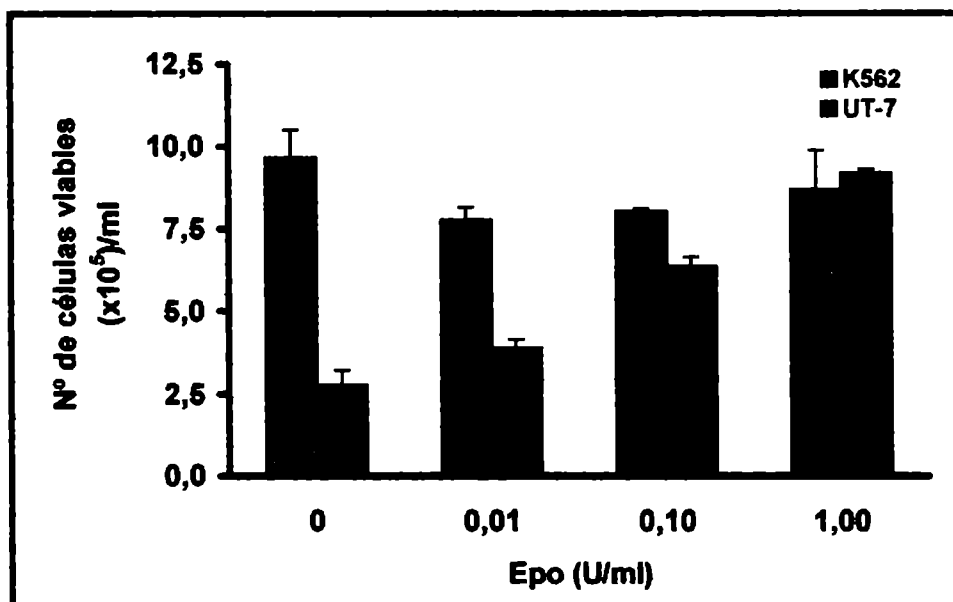


Figura III.2

Dependencia de las líneas celulares a eritropoyetina

Células K562 y UT-7 (2×10^5 /ml) fueron incubadas en el medio apropiado durante 72 h en presencia de concentraciones crecientes de Epo, a 37°C, en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO₂. El número de células viables fue determinado mediante tinción con azul Tripán y recuento en cámara de Neubauer modificada.

Los resultados están expresados como Media \pm SEM (n=5).

Coeficiente r de Pearson entre el crecimiento celular de la línea UT-7 y la concentración de Epo = 0,83.

El crecimiento de células UT-7 es totalmente dependiente de eritropoyetina en una relación directa con la dosis suministrada. Contrariamente, las células K562 no responden a la hormona para su crecimiento. Ninguna de las dos líneas celulares responden a la eritropoyetina para diferenciarse a células eritroides maduras.

ACCIÓN DEL ALUMINIO SOBRE LA FUNCIÓN ANTIAPOPTOTICA DE LA ERITROPOYETINA

Una de las principales funciones de la Epo es mantener el proceso de diferenciación eritroide, regulando la producción de células maduras. Se ha sugerido que la Epo protegería a las células progenitoras de la muerte celular programada (Mulcahy, 2001). Los resultados graficados en la Figura III.2 muestran que las células K562 son independientes de Epo para crecer y diferenciarse. A pesar de esto, se conoce que estas células poseen receptores para la hormona. Esto lleva a postular, entonces, que la expresión del EpoR en las células K562 podría estar relacionada con la prevención de apoptosis. Para analizar esta hipótesis, se examinó la habilidad de la Epo para inhibir la muerte celular programada inducida por hemina en la línea celular K562.

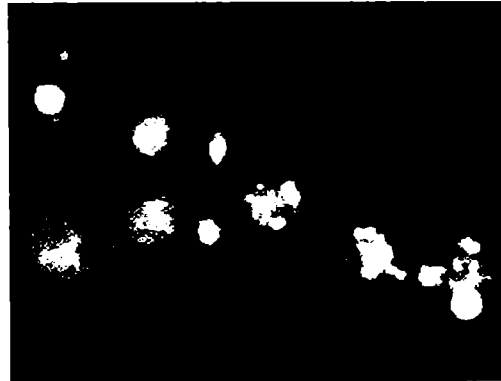
Las células fueron incubadas con hemina (H) para inducir apoptosis. Con el fin de evaluar el efecto antiapoptótico de la Epo, las células fueron, además, incubadas con la hormona.

La técnica de tinción diferencial con colorante de Hoechst fue empleada para evaluar la apoptosis producida en cultivos de 5 días. Este colorante nuclear pone en evidencia características de las células que se asocian al proceso de muerte celular programada, tales como condensación de cromatina y fragmentación nuclear. En células no apoptóticas, los núcleos fluorescen uniformemente sobre un fondo extracelular oscuro, mientras que la cromatina condensada se observa en forma de puntos brillantes en células que sufrieron apoptosis (Fig. III.3.a, microfotografía).

Células cultivadas sin agregado de H o de Epo sufrieron un grado de apoptosis espontánea (C) de $4 \pm 0,4$ % (Fig. III.3.b). La inducción con H produjo un aumento de 6 veces en el número de células apoptóticas. Este efecto apoptótico, a su vez, sufrió una reducción de, aproximadamente, 50 % por acción de Epo.

Como se mencionó anteriormente, una de las principales hipótesis de este estudio postulaba que la interferencia de Al con las funciones de la Epo podría explicar el efecto inhibitorio sobre la respuesta a la hormona de las células progenitoras CFU-E. Se investigó, entonces, si el Al era capaz de modular el efecto antiapoptótico de la Epo. Cuando células K562, inducidas a apoptosis por H, fueron cultivadas en presencia de Epo y Al, el efecto protector de la Epo fue prácticamente anulado, aunque el Al *per se* no produjo un efecto proapoptótico en estas células (Fig. III.3.b).

a)



b)

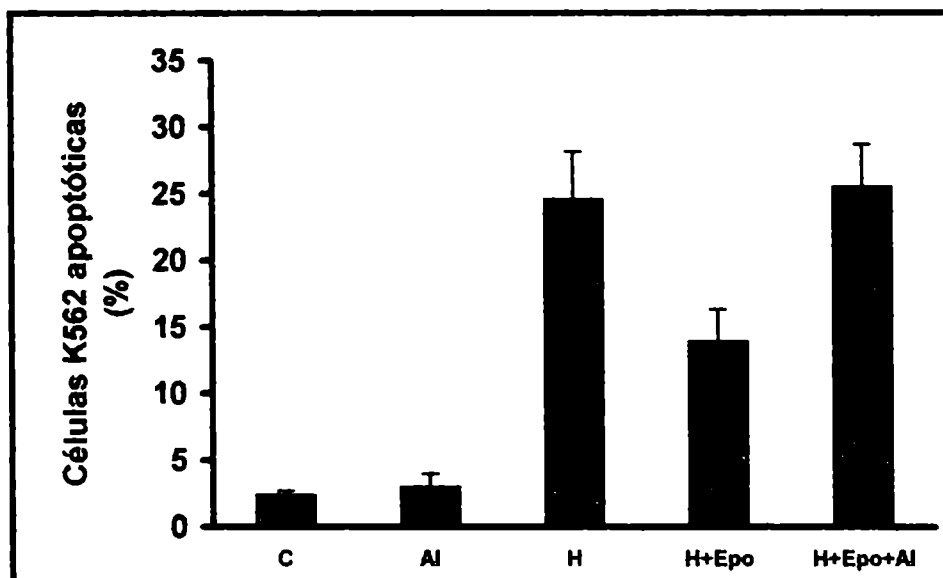


Figura III.3

Acción del aluminio sobre la función antiapoptótica de eritropoyetina en células K562

Células K562 fueron cultivadas sin tratamiento (C) o con el agregado de hemina $35 \mu\text{M}$ (H); con H $35 \mu\text{M}$ y 10 U Epo/ml (H+Epo); con H $35 \mu\text{M}$, 10 U Epo/ml y citrato de Al $100 \mu\text{M}$ (H+Epo+Al) o con citrato de Al $100 \mu\text{M}$ (Al). Después de 5 días se realizó la coloración con el reactivo de Hoechst y se efectuó el recuento celular diferencial, sobre un total de 600 células, con microscopio de fluorescencia. a) Microfotografía con células apoptóticas (400x). b) Las barras representan el porcentaje (Media \pm SEM) de células apoptóticas con respecto al número total de células ($n=5$). Se encontraron diferencias significativas entre C ó Al vs. cada uno de los 3 grupos restantes ($P<0,01$) y entre H+Epo y los grupos H y H+Epo+Al ($P<0,05$, prueba de Kruskal-Wallis).

Como consecuencia de la exposición a Al no se encontraron alteraciones en el crecimiento ni en la viabilidad celular, determinadas por la técnica de exclusión del colorante azul Tripán. Las células K562 cultivadas durante 5 días en presencia de Al crecieron 96 ± 3 % con respecto a las controles que no tuvieron contacto con el metal. La viabilidad celular no difirió entre ambos cultivos, detectándose $93 \pm 1,0$ % de células viables después de haber estado expuestas a Al y $93 \pm 1,2$ % en cultivos controles. Estos resultados confirman que el Al no es un factor proapoptótico, sino que afecta la habilidad protectora de la Epo.

Dado que la línea UT-7 depende de Epo para crecer (Fig. III.2), se puede lograr apoptosis privando a las células de la hormona. Bajo estas condiciones, se evaluó el efecto de Al sobre el proceso de apoptosis en esta línea celular. Como se esperaba, las células UT-7 crecidas sin Epo durante tres días, sufrieron un alto grado de apoptosis, la cual fue prevenida por Epo (Fig. III.4). No se observaron cambios en los cultivos debido a la presencia de Al.

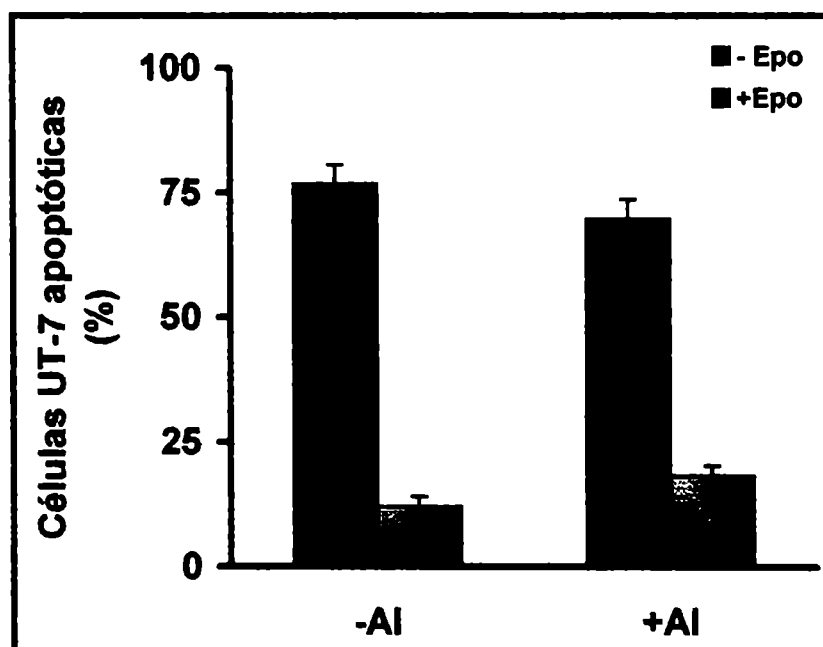


Figura III.4

Protección antiapoptótica de células UT-7 por efecto de eritropoyetina

Células UT-7 fueron inducidas a apoptosis, privando a las mismas del factor de crecimiento (-Epo) y el efecto antiapoptótico de la hormona fue estudiado en cultivos estimulados con Epo (+Epo), en presencia (+Al) o ausencia (-Al) de citrato de Al $100 \mu\text{M}$. Después de 72 h se realizó la coloración con el reactivo de Hoechst y se efectuó el recuento celular diferencial, sobre un total de 600 células, con microscopio de fluorescencia. Las barras representan el porcentaje (Media \pm SEM) de células apoptóticas con respecto al número total de células ($n=5$). Diferencias significativas ($P<0,01$) fueron encontradas entre los cultivos realizados con y sin Epo (Prueba de Mann-Whitney).

La eritropoyetina ejerce su efecto protector en células K562, disminuyendo la muerte celular programada inducida por hemina, mientras que el aluminio anula esa protección. En la línea celular UT-7, la eritropoyetina inhibe la apoptosis celular

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA EXPRESION DEL RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA EN CELULAS K562

El mecanismo por el cual el Al afecta la capacidad antiapoptótica de la Epo en células K562 podría estar relacionado con una disminución de la disponibilidad de receptores de membrana para la hormona o con la interferencia del Al con alguna señal relacionada con la activación del EpoR. Se examinó la expresión y fosforilación del EpoR por inmunoprecipitación y *Western blot*.

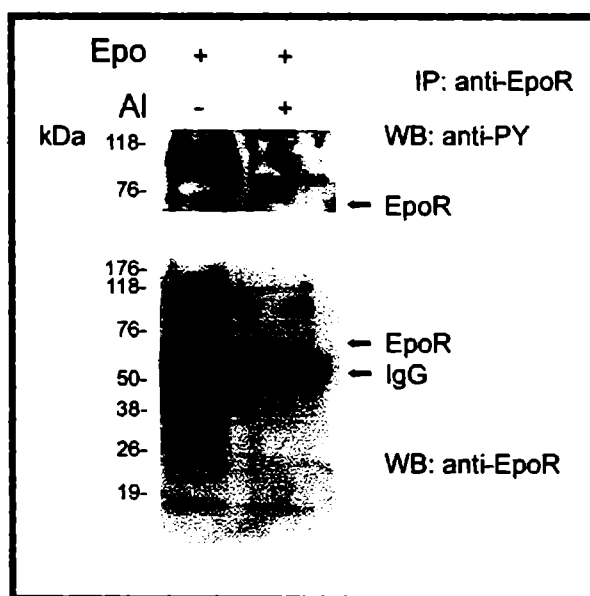


Figura III.5

Expresión y fosforilación del EpoR en células K562 cultivadas en presencia de aluminio

Células K562 fueron incubadas en presencia de citrato de Al 100 μ M durante 5 días. Estas y células controles recibieron un pulso de 10 U Epo/ml durante 10 min a 37°C. Lisados de 10^7 células fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpo anti-EpoR y las proteínas separadas electroforéticamente. La detección se realizó por Western blot (WB) con anticuerpo anti-fosfotirosina (Panel superior) y luego del "stripping", con anticuerpo anti-EpoR (Panel inferior). Los Western blot exhibidos, son representativos de 3 ensayos.

En la Figura III.5 se observa una disminución de la expresión del EpoR en las células que estuvieron previamente en contacto con compuestos de Al (Panel inferior, +Al).

La concomitante señal de fosforilación (Panel superior, +Al), disminuida con respecto a la de las células no tratadas (Panel superior, -Al), podría ser atribuida a la menor expresión del EpoR.

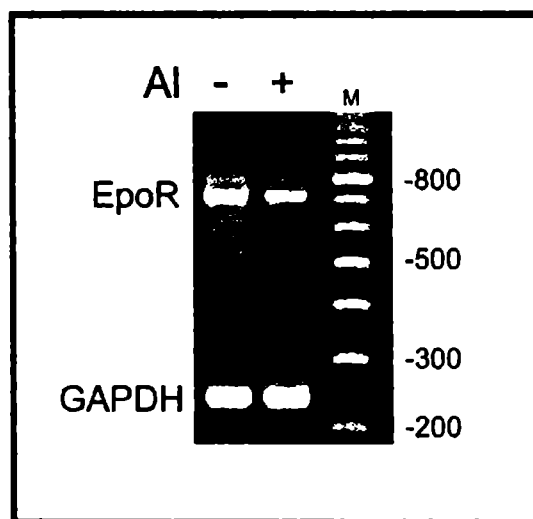
El tratamiento previo de células K562 con aluminio induce una disminución de los niveles de receptor de eritropoyetina y de los productos de fosforilación asociados al receptor activado.

NIVELES DE ARNm DEL RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS K562 EXPUESTAS A ALUMINIO

Se investigó si la disminución de los EpoR en células K562, causada por acción del Al, se debía a una disminución de los ARNm del EpoR.

Los niveles de ARNm de células K562 tratadas con citrato de Al y de células controles fueron determinados por RT-PCR (Fig. III.6).

a)



b)

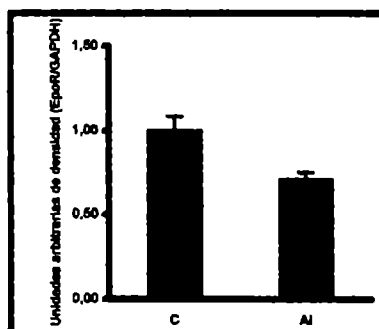


Figura III.6

Niveles de ARNm del EpoR de células K562 expuesta a aluminio

El ARN total fue extraído de células K562 sin tratamiento adicional (-Al) y tratadas con citrato de Al 100 μ M durante 5 días (+Al). Las señales de ADNc del EpoR obtenidas después de RT-PCR, fueron cuantificadas y normalizadas con respecto a las señales de GAPDH (b). En cada gel se incluyó un marcador de pares de bases que permitió identificar las bandas por su tamaño (M). El gel exhibido es representativo de 3 ensayos (a).

En concordancia con la disminuida expresión de proteína EpoR, se encontró una disminución de los niveles de ARNm del EpoR en células previamente expuestas a Al (Fig. III.6, +Al).

La menor expresión del receptor para eritropoyetina en las células K562 preincubadas con compuestos de aluminio se encuentra asociada con una disminución de los niveles de ARNm del receptor.

EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR ERITROPOYETINA EN CÉLULAS UT-7

En base a los antecedentes que apoyan una posible acción perjudicial del Al sobre la actividad de la Epo en células eritroides y, teniendo en cuenta que las células UT-7 dependen totalmente de Epo para su supervivencia, se estudió la posibilidad de que el metal afectara la proliferación de células de esta línea. Para ello se empleó la prueba de exclusión del colorante azul Tripán (Fig.III.7).

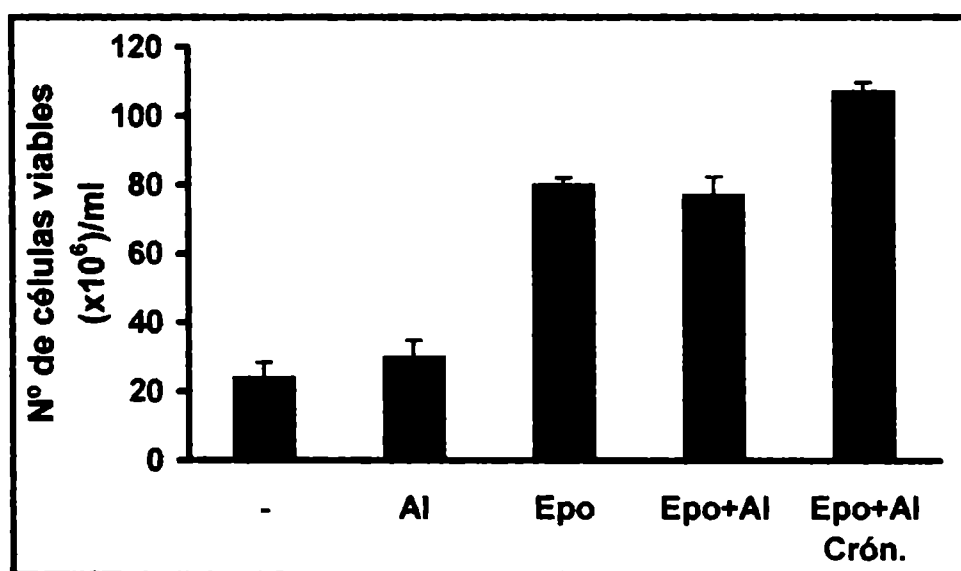


Figura III.7

Proliferación de células UT-7 expuestas a aluminio en respuesta a eritropoyetina

Se determinó el crecimiento y viabilidad de células UT-7 (2×10^5 /ml) estimuladas con 1 U Epo/ml sin agregado de Al (Epo) en presencia de citrato de Al $100 \mu\text{M}$ durante 5 días (Epo+Al) o con citrato de Al $100 \mu\text{M}$ por un período de 30 días (Epo+Al crónico). Simultáneamente, se estudió el efecto de citrato de Al $100 \mu\text{M}$ durante 5 días en ausencia de Epo (Al). Células controles fueron incubadas durante el mismo período sin el agregado de ambos compuestos (-). Los resultados de 5 ensayos independientes están expresados como Media \pm SEM.

La disminuida viabilidad de las células incubadas sin Epo (-) no fue modificada por la presencia de Al en el medio de cultivo (Al).

Mientras que el tratamiento con Al a corto plazo no afectó la proliferación celular inducida por Epo (Epo+Al vs. Epo), la exposición crónica al metal incrementó la respuesta proliferativa de estas células a la Epo (Epo+Al crónico), siendo la diferencia entre los grupos (Epo+Al crónico) y (Epo) estadísticamente significativa: $107 \pm 3 \cdot 10^6$ cél./ml vs. $80 \pm 2 \cdot 10^6$ cél./ml, (n=5, $P < 0,05$, prueba de Mann-Whitney).

La exposición prolongada de células UT-7 a compuestos de aluminio produce un aumento significativo de la respuesta proliferativa mediada por eritropoyetina.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS UT-7 EXPUESTAS A ALUMINIO

El siguiente paso fue investigar si la modificación de la respuesta de células UT-7 a Epo bajo condiciones de exposición crónica a Al, se encontraba relacionada con una modulación del EpoR. Se estudió la expresión del EpoR por inmunoprecipitación y *Western blot* de células UT-7 incubadas durante períodos prolongados (30 días) con citrato de Al.

Los resultados, representativos de 5 ensayos diferentes, se muestran en la Figura III.8. La expresión del EpoR y la fosforilación de tirosina asociada, aumentaron en las células expuestas a Al (+Al) con respecto a las células cultivadas en medio libre del metal (-Al).

El aumento de la respuesta de células UT-7 cultivadas en ausencia de la hormona está relacionado con un incremento en la expresión de receptores para eritropoyetina debido a la exposición prolongada a compuestos de aluminio.

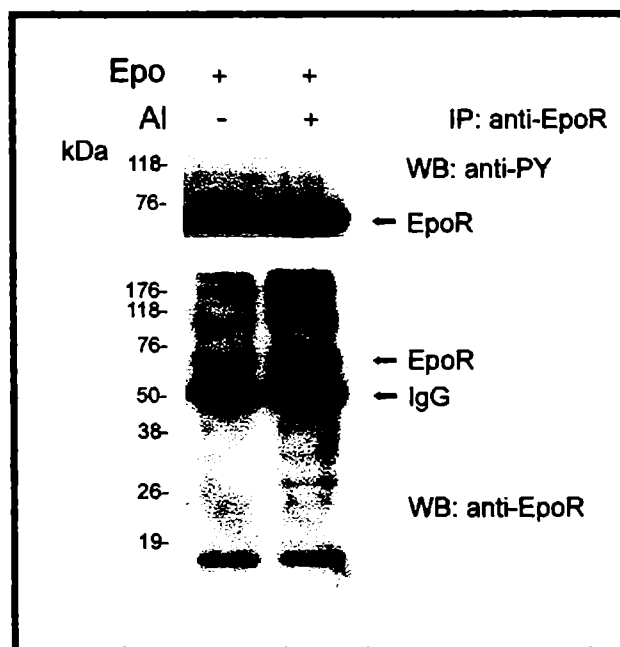


Figura III.8

Expresión y fosforilación del EpoR en células UT-7 expuestas a aluminio

Células UT-7 expuestas a citrato de Al 100 μ M durante periodos prolongados (30 días) y células sin tratamiento fueron incubadas sin Epo durante la noche. Luego, fueron estimuladas con 10 U Epo/ml por 10 min a 37°C. Lisados de 10^7 células fueron inmunoprecipitados con anti-EpoR y las proteínas separadas electroforéticamente. La detección de las proteínas se realizó por Western blot (WB) con anticuerpo anti-fosfotirosina (Panel superior) y luego del "stripping", con anticuerpo anti-EpoR (Panel inferior). Los blots exhibidos son representativos de 5 ensayos.

MODULACIÓN DEL ARNm DEL RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA EN CELULAS UT-7 EXPUESTAS A ALUMINIO

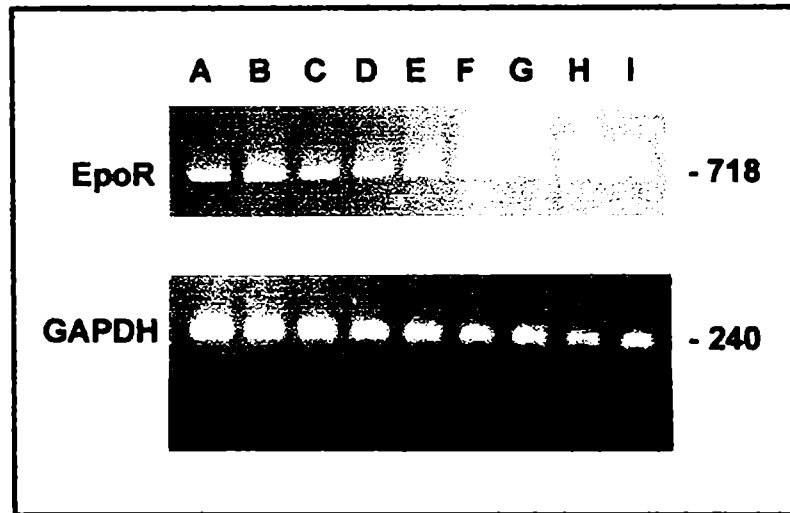
Con el fin de evaluar si el Al altera la regulación normal de los niveles de ARNm del EpoR, se compararon los niveles de mensajeros correspondientes a células cultivadas por diferentes períodos en presencia de Al.

Los niveles de ARNm fueron determinados por RT-PCR (Fig.III.9).

En concordancia con trabajos previos (Migliaccio *et al*, 1993; Komatsu *et al*, 1997), la respuesta normal de células UT-7 a la falta de factor de crecimiento se vio reflejada en un aumento transitorio del nivel de ARNm, el cual retornó a los niveles basales por el posterior agregado de Epo (B vs. A y G). No se encontró un efecto adicional por incubación de las células con citrato de Al durante 5 días (C, D, H). Sin embargo, el ARNm del EpoR fue sobreexpresado en células crónicamente expuestas a Al en

ausencia del factor de crecimiento (F vs. B), mientras que la adición subsiguiente de Epo retornó el ARNm del EpoR a los niveles basales (I vs. G).

a)



b)

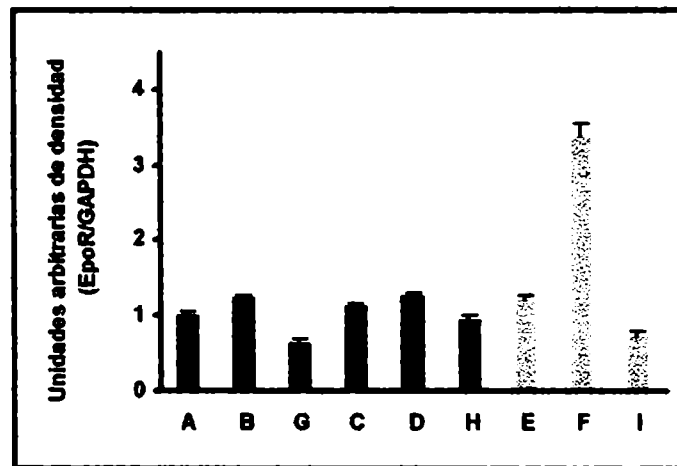


Figura III.9

Modulación del ARN m del EpoR de células UT-7 expuestas a aluminio

Se emplearon células UT-7 sin tratamiento con Al (azul oscuro A, B, G); incubadas con citrato de Al 100 μ M, 5 días (azul claro C, D, H) o expuestas a citrato de Al 30 días (celeste E, F, I). Las células de los tratamientos B, G, D, H, F e I fueron incubadas durante una noche sin Epo y las de los tratamientos G, H e I fueron cultivadas, por 24 h adicionales, en presencia de Epo. El ARN total fue extraído y, después de RT-PCR, fueron observadas las señales de ADNc del EpoR (a). En cada gel se incluyó un marcador de pares de bases que permitió identificar cada banda por su tamaño. Las señales fueron cuantificadas y normalizadas con respecto a GAPDH y son expresadas en unidades arbitrarias (b). El gel es representativo de tres ensayos.

El incremento en los niveles de ARNm de células con exposición crónica a aluminio concuerda con el aumento de la expresión de los receptores para la hormona bajo las mismas condiciones de activación celular. La modulación de los niveles de ARNm de células UT-7 tratadas con aluminio durante períodos prolongados, se encuentra alterada en relación a la modulación normal sugiriendo un aumento de los requerimientos de estas células por el factor de crecimiento.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos en el presente capítulo muestran que el aluminio afecta a los progenitores eritroides de origen humano, sugiriendo que estas células son tan sensibles a la exposición al metal como las de animales de experimentación.

La disminución del crecimiento de CFU-E humanas, observada en cultivos desarrollados en presencia de aluminio (Fig. III.1), es concordante, aunque de menor magnitud que la inhibición de CFU-E detectada cuando se realizaron cultivos de células de médula ósea de animales expuestos previamente a compuestos de aluminio *in vivo* durante un período prolongado (Fig. I.3).

Dado que el desarrollo de CFU-E *in vitro* refleja la capacidad de respuesta de células progenitoras eritroides al estímulo por eritropoyetina, surgió la hipótesis de que la inhibición ocasionada por aluminio podría deberse a una interferencia provocada por el metal en la interacción de la eritropoyetina con su células blanco.

El estudio de la acción de la eritropoyetina y de los posibles efectos tóxicos del aluminio sobre mecanismos involucrados en la vía de activación del receptor se vio obstaculizado por la dificultad de obtener cantidades substanciales de células eritroides fisiológicas sensibles a eritropoyetina en un estadio de maduración homogéneo y de mantener a las mismas en cultivos estables para realizar experimentos prolongados. En ese sentido, ha sido de gran utilidad el estudio del comportamiento de células inmortalizadas. Por lo tanto, en los ensayos del presente capítulo, enfocados a investigar posibles alteraciones en los caminos de señalización provocadas por la exposición a aluminio, se emplearon las líneas celulares humanas K562 y UT-7, las cuales expresan receptores de superficie para eritropoyetina (Fig. III.5 y III.8) pero tienen distinta dependencia de la hormona (Fig. III.2).

Como fue descrito en la Introducción, los efectos biológicos promovidos por eritropoyetina son mediados por señales intracelulares desencadenadas a partir de la unión de la hormona con el EpoR expresado en la superficie celular. El análisis de los resultados experimentales permite sugerir que el aluminio no afectaría la formación del complejo Epo-EpoR, ya que la presencia del metal no impidió el crecimiento de células UT-7 inducido por la hormona (Fig. III.7).

Sin embargo, la incapacidad del aluminio para producir *per se* un efecto sobre el crecimiento de las células UT-7 (Fig. III.7) o sobre la viabilidad celular de la línea

K562, sugiere una interferencia del metal en la actividad de la eritropoyetina. Una relación directa entre la acción del aluminio y la presencia de eritropoyetina había sido demostrada, previamente en el laboratorio, por ensayos de inhibición *in vitro* del desarrollo de CFU-E. Cuando células de médula ósea de ratón fueron preincubadas conjuntamente con eritropoyetina y aluminio, y lavadas antes de iniciar el cultivo estimulado por la hormona sin reagregado de aluminio, el crecimiento de CFU-E se vio inhibido y no ocurrió así cuando la incubación previa fue realizada sólo con el metal (Garbossa *et al*, 1994). En coincidencia con los resultados del capítulo I, este hallazgo también indica un efecto irreversible que perdura en las células aún después de haber sido aisladas del medio rico en aluminio.

En base a estos resultados, se investigó la posibilidad de que el aluminio, sin alterar la formación del complejo Epo-EpoR, afectara la activación del receptor.

En el linaje eritroide, la eritropoyetina regula la producción de glóbulos rojos permitiendo a los precursores eritroides proliferar y madurar, mientras protege a las células de apoptosis (Koury & Bondurant, 1990). En base a la evidencia experimental de que las células K562 son independientes de eritropoyetina para crecer (Fig. III.2) y diferenciarse, se supuso que la ruta de activación del EpoR por eritropoyetina en estas células está principalmente, si no únicamente, orientada a prevenir la muerte celular programada, y sobre este efecto se investigó la acción del aluminio. Cuando células K562 inducidas a apoptosis fueron cultivadas con eritropoyetina y aluminio, la presencia del metal revirtió el efecto antiapoptótico de la hormona (Fig. III.3.b).

Teniendo en cuenta que la activación del receptor para eritropoyetina está asociada con procesos de fosforilación, se examinó la expresión del EpoR y la fosforilación asociada, para determinar si la inhibición del efecto antiapoptótico de la eritropoyetina en las células K562 podía relacionarse con una interferencia del aluminio sobre señales de activación desencadenadas por eritropoyetina. Los ensayos de inmunoprecipitación, *Western blot* y RT-PCR revelaron una menor expresión de EpoR, a nivel de ARNm (Fig III.6, +Al) y de proteína (Fig. III.5), en células previamente expuestas a aluminio. La concomitante débil señal de fosforilación del EpoR (Fig. III.5) puede ser atribuida a la disminución de la expresión del receptor aunque, de todos modos, el resultado justifica la depresión de las señales de activación mediadas por el complejo Epo-EpoR.

Esta modulación negativa de la expresión del EpoR inducida por aluminio sería consistente con un mecanismo que involucrara una disminución de la expresión de Bcl-X_L, una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2. Esta propuesta está sustentada en la elevada expresión de Bcl-X_L observada por otros autores en células K562. Este

mecanismo protegería a las células de la apoptosis causada por agentes inductores como la hemina (Benito *et al*, 1996). En este y en otro trabajo (Silva *et al*, 1999), los autores han sugerido que al menos uno de los caminos moleculares involucrados en la supervivencia de los progenitores eritroides puede ser desencadenado por la interacción de la eritropoyetina con su receptor específico, aumentando la expresión de Bcl-X_L a través de la unión de STAT5 activado al promotor *bcl-x_L*. De esta manera, el aluminio promovería apoptosis por anulación del efecto protector de la eritropoyetina.

En lo que se refiere a las células de la línea UT-7, era esperable que sufrieran un elevado grado de apoptosis al ser privadas del factor de crecimiento, dada la importante dependencia de eritropoyetina que manifiestan para su crecimiento (Fig. III.2). La apoptosis fue contrarrestada casi totalmente por la hormona, de tal manera que los cambios, de haberse producido alguno por acción del aluminio, podrían haber resultado enmascarados (Fig. III.4).

Para visualizar un posible efecto inhibitorio del aluminio sobre la hormona en estas células, se estudió la acción del metal sobre la proliferación inducida por eritropoyetina. Sin embargo, a diferencia de lo observado en células K562, la exposición al metal produjo un aumento de la proliferación celular de las UT-7 (Fig. III.7). Después de un tratamiento crónico con aluminio se detectó una acción sinérgica del metal con el factor de crecimiento. Dado que este metal no actúa como factor de crecimiento en ausencia de eritropoyetina, la alteración observada fue adjudicada a un incremento de la respuesta de estas células a la hormona.

Con respecto a la modulación del receptor en las células UT-7, sólo una exposición muy prolongada a aluminio indujo la regulación, en este caso positiva, de la expresión del EpoR y de la fosforilación asociada, en respuesta a la ausencia de eritropoyetina (Fig. III.8). Bajo esas condiciones de falta del factor de crecimiento, las células mostraron un aumento transitorio de tres veces en los niveles de ARNm del EpoR con respecto a las células controles (Fig. III.9). Estos resultados indicarían la necesidad de un mayor requerimiento de eritropoyetina, inducida por la exposición crónica a aluminio.

Hipersensibilidad a la eritropoyetina ha sido observada en células que expresan formas truncadas de EpoR, los que carecen de una porción del dominio intracitoplasmático que actúa como sitio de acción de fosfatasas. Por eso, en células que portan estas mutaciones, como en el caso de pacientes con policitemia congénita, se encuentra anulada una de las vías de regulación negativa de la cascada de señalización, lo que conduce a la producción de eritrocitosis (Skol *et al*, 1995).

Si bien, la línea celular UT-7 expresa ambas formas del receptor, el análisis por RT-PCR no mostró una regulación positiva del EpoR-truncado con respecto al EpoR-completo como consecuencia de la exposición celular a Al.

Los modelos experimentales de células humanas expuestas a aluminio, descritos en este capítulo, resultaron útiles para demostrar algunos de los múltiples eventos desarrollados por los mecanismos activados por eritropoyetina, ya que los efectos del aluminio sobre la activación inducida por la hormona en ambas líneas celulares fue diferente. Teniendo en cuenta que el metal no interfiere con la unión del complejo Epo-EpoR pero afecta la respuesta a la eritropoyetina aún después de su remoción del entorno celular, se sugiere que la acción del metal estaría confinada al interior de la célula. De hecho, se ha demostrado que el aluminio es internalizado tanto por caminos mediados por receptores cuando es transportado por transferrina (Pérez *et al*, 2001) como por caminos independientes de esta vía (Pérez *et al*, 2002).

Se ha reportado que la eritropoyetina induce un aumento de los receptores de superficie para transferrina en células K562 (Weiss *et al*, 1997), aunque no hay datos para las células UT-7. Es apropiado suponer que la estimulación celular por eritropoyetina facilitaría la captación de aluminio, ya que la transferrina presente en el suero fetal bovino podría haber actuado como vehículo en las experiencias realizadas. Una vez dentro de la célula, el aluminio podría inducir la modulación de los eventos asociados con la activación del receptor de eritropoyetina como consecuencia de la unión del complejo Epo-EpoR.

¿Cuáles serían los posibles mecanismos de toxicidad involucrados?

Ya se ha mencionado que la señalización intracelular de la activación por eritropoyetina es controlada por procesos de fosforilación y desfosforilación de varias moléculas de transducción, incluido el receptor. Dado que el aluminio se une fácilmente a biomoléculas conteniendo grupos fosfato (Martin, 1986), no se puede descartar una participación directa del metal en esos importantes procesos. Se ha demostrado que la unión de aluminio a macromoléculas celulares a través de sus grupos fosfato induce cambios en la susceptibilidad de esos grupos por las enzimas que actúan específicamente sobre ellos (Nayak & Chatterjee, 2001).

Alternativamente, otros mecanismos podrían explicar la modulación del receptor inducida por aluminio. En trabajos de otros investigadores ha sido sugerido que la regulación de los niveles de ARNm del EpoR en células UT-7 en proceso de proliferación estaría asociada con varios eventos controlados por el ciclo celular o relacionado con él (Komatsu *et al*, 1997). En ese contexto, se ha reportado que el

aluminio es capaz de influir en la replicación de osteoblastos induciendo la transición desde la fase G₀ a la fase S en el ciclo celular (Quarles *et al*, 1991), mientras que desencadena la apoptosis de astrocitos, por mecanismos asociados con un cambio significativo en la distribución del ciclo celular caracterizado por una acumulación de células en la fase G₂/M (Guo & Liang, 2001). Esta discrepancia aparente apoyaría que las diferencias encontradas en el presente capítulo fueran consecuencia de las características particulares de ambas líneas celulares y sus distintos estadios de maduración.

Cabe destacar que, recientemente, se ha involucrado al aluminio en procesos inflamatorios. Este efecto fue descrito en base a la relación entre la presencia del metal y signos clínicos de inflamación, así como por la inducción de mediadores proinflamatorios (Bondy & Campbell, 2001; Lauricella *et al*, 2001). La hipótesis de un comportamiento proinflamatorio del aluminio explicaría la acción del metal sobre señales de activación del EpoR, dado que otros mediadores proinflamatorios, como algunas citoquinas, interactúan con receptores de membrana de células *target*, modificando cascadas intracelulares de transducción en caminos de señalización compartidos por el EpoR (Zhang *et al*, 1998; Krebs & Hilton, 2000).

En conclusión, los resultados revelaron que la presencia de aluminio en los cultivos celulares afecta la actividad de la eritropoyetina por mecanismo(s) que involucran a su receptor. Las líneas celulares empleadas tuvieron, bajo los efectos de aluminio, comportamientos diferentes. Mientras que la presencia del metal indujo en células K562 una regulación negativa de los niveles de ARNm y de la expresión del receptor (Fig. III.6 y III.5), concomitantemente con la anulación de la acción antiapoptótica de eritropoyetina (Fig. III.3), mostró un efecto opuesto tanto sobre la proliferación celular (Fig. III.7) como sobre la expresión del EpoR en células de la línea UT-7 (Fig. III.8 y III.9). Estas observaciones sugieren que los mecanismos involucrados en la acción de eritropoyetina, y no en la acción del tóxico, serían de distinta naturaleza en las dos líneas celulares. Otros trabajos coinciden en postular diferentes caminos de señalización para las funciones de activación o protección celular mediadas por eritropoyetina (Carroll *et al*, 1995; Lawson *et al*, 2000; Sawyer & Jacobs-Helber, 2000; Sui *et al*, 2000). De acuerdo a los presentes resultados, la eritropoyetina activaría caminos principalmente relacionados con la prevención de muerte celular programada en células K562, mientras que en la línea celular UT-7 afectaría dos tipos de señales, unas involucradas en la estimulación de proliferación celular y otras en la apoptosis, explicando, así, la diferente respuesta a la hormona mostrada por ambas líneas celulares.

CONSIDERACIONES FINALES

ALUMINIO Y ERITROPOYESIS

La acumulación de aluminio en el organismo después de una exposición crónica por vía oral se ve reflejada en un aumento importante de la concentración del metal en circulación y el depósito en varios tejidos. Entre los «marcadores de riesgo» que se describen para caracterizar la exposición a tóxicos, el parámetro mencionado en primer término puede constituir un «marcador de exposición» apropiado, debido a que el compartimiento sanguíneo resulta de muy fácil acceso y la concentración de aluminio en plasma es un signo evidente de exposición al metal. La dosis interna y/o el tiempo de exposición durante el cual están en contacto los órganos son factores que determinan el grado de acumulación del tóxico en los tejidos, depósito que sugiere un desbalance entre las velocidades de ingreso y de remoción. Los niveles de aluminio depositado en tejidos como el hueso, de difícil movilización del metal, pueden ser considerados «marcadores de dosis interna o de acumulación tisular». La marcada reducción de la respuesta de CFU-E al estímulo de eritropoyetina es la capacidad funcional de los progenitores eritroides afectada por el tóxico, y como tal, constituye un verdadero «marcador de efecto». El hallazgo reiterado y, en ocasiones antes de la observación de signos de anemia, como se había demostrado en trabajos anteriores, permite suponer que los progenitores eritroides de la médula ósea constituyen un compartimiento particularmente sensible a la acción del aluminio. La liberación lenta del metal acumulado en el tejido óseo podría favorecer una exposición endógena prolongada de las células responsables de la eritropoyesis en la médula ósea.

Junto con la disminuida respuesta de CFU-E a la eritropoyetina, los cambios morfológicos de los eritrocitos maduros constituyen las alteraciones más severas producidas como consecuencia de la presencia continua de aluminio en el entorno celular, mientras que los signos de anemia, concordantes con una anemia hemolítica, son leves o moderados. Dada la dependencia del tiempo de exposición que muestran las alteraciones inducidas por el metal se podría esperar el desarrollo de un efecto “anemizante” más pronunciado en exposiciones prolongadas.

No se descarta que, en parte, los notables cambios en la morfología de los eritrocitos que circulan en un medio rico en aluminio, podrían haber sido generados ya en células progenitoras, aunque, indudablemente, se ha demostrado que el metal ejerce una acción directa sobre las células maduras. Ello se deriva de las alteraciones observadas en eritrocitos envejecidos *in vitro* en presencia de aluminio y de la detección del metal solamente dentro de los glóbulos rojos con características atípicas.

Más aún, el efecto directo del metal parece localizarse sobre la membrana eritrocitaria, ya que se acumula en ese compartimiento e induce la degradación de la banda 3, principal proteína que une la membrana plasmática con el citoesqueleto, estabilizando al eritrocito. La transformación de la forma discoide de los hematíes en acantocítica o estomatocítica podría adjudicarse no sólo al desequilibrio de la interrelación entre los componentes de la membrana, sino también a interacciones del metal con las monocapas, externa y citoplasmática, de la bicapa lipídica. Es probable que la inestabilidad generada en la membrana tenga consecuencias hematológicas, ya que datos de la bibliografía han mostrado que la deficiencia total por mutación genética de la proteína banda 3 induce severa anemia hemolítica.

En cuanto a la disminuida respuesta de los progenitores eritroides a la eritropoyetina por efecto del aluminio, se puede sugerir que tal efecto estaría mediado por la interferencia del metal en el mecanismo de activación celular por la hormona.

La exposición a aluminio no se evidencia a nivel ligando receptor, aunque involucra la modulación del EpoR.

El aluminio no afecta *per se* la viabilidad celular de la línea K562, pero anula la actividad antiapoptótica de la eritropoyetina sobre estas células, las que, a su vez, son independientes de la hormona para proliferar y diferenciarse. La inhibición se produce a través de la reducción de la expresión de los receptores *target* para eritropoyetina, en concordancia con los niveles de su ARNm. Las células de la línea UT-7 son, en cambio, totalmente dependientes de eritropoyetina y la exposición a aluminio aumenta aún más su requerimiento de la hormona. En conjunto, estos resultados confirman un efecto del aluminio sobre la actividad de la eritropoyetina, a la vez que sustentan la hipótesis concerniente a la existencia de diferentes caminos involucrados en las funciones de la hormona .

Los comportamientos de las células K562 y UT-7 en presencia de aluminio, si bien tienen distintas características, podrían explicar la acción observada en ensayos *in vitro* y *ex vivo* por exposición a aluminio de los progenitores eritroides CFU-E. Por un lado, este metal no esencial modificaría la función antiapoptótica de la eritropoyetina sobre las células progenitoras, impidiendo, de esta manera, su desarrollo, lo que avalaría la hipótesis de que la eritropoyetina no está involucrada en el compromiso del linaje eritroide. Esta hipótesis sugiere que la hormona actuaría, principalmente, como un factor antiapoptótico manteniendo las células vivas para permitirles continuar con su programa endógeno de maduración. Por otro lado, las células progenitoras de médula ósea podrían responder a la acción del tóxico durante períodos prolongados de exposición *in vivo*, sufriendo adaptaciones tales que permitieran aumentar su

sensibilidad a la eritropoyetina o a otros factores de crecimiento, y así atenuar los signos de anemia. Estas células progenitoras dependen de eritropoyetina pero, a diferencia de las de la línea UT-7, se diferencian. Por eso, sufren distintos efectos por exposición crónica a aluminio, los cuales podrían estar influenciados por el ciclo celular. Las CFU-E muestran un efecto "tóxico" irreversible que se manifiesta aún cuando han sido separadas del entorno rico en depósitos del metal. Se sugiere, entonces, que el metal internalizado actúa sobre la respuesta celular a eritropoyetina.

FUNCIONES DE LA ERITROPOYETINA

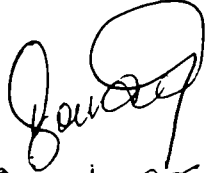
Evidentemente, no todas las células que expresan receptores para eritropoyetina son afectadas en la misma forma por la hormona. Los resultados obtenidos con células K562 y UT-7, coinciden con la existencia de diferentes rutas de acción y distintos mecanismos de regulación para los múltiples efectos atribuidos a la eritropoyetina. Datos de la bibliografía indican que las señales que promueven proliferación estarían separadas de las que promueven protección de apoptosis y las moléculas involucradas en ambos mecanismos serían diferentes, aunque las bases moleculares de esta "decisión celular" no han sido totalmente aclaradas todavía.

Los resultados de este trabajo son consistentes con la existencia de diferentes mecanismos de transducción de señales por los cuales la eritropoyetina promueve, proliferación celular o prevención de apoptosis, a pesar de estar ambos mediados por la activación del EpoR. Más aún, este estudio aporta un modelo para clarificar los mecanismos por los cuales la eritropoyetina promueve supervivencia o proliferación y sugiere que no todos los factores intracelulares necesarios para garantizar las diferentes vías de señalización de la activación celular por eritropoyetina estarían disponibles en las células que expresan el receptor.

Si bien la eritropoyetina recombinante humana es un importante agente terapéutico para el tratamiento de la anemia, se ha demostrado resistencia al tratamiento. Esta resistencia ha sido asociada a acumulación de aluminio, a la presencia de receptores solubles de EpoR o a mediadores proinflamatorios, por lo que, a la luz de los presentes resultados, podría ser investigada con respecto a los mecanismos celulares de activación mediados por el receptor para eritropoyetina.

Por otra parte, los receptores de membrana para eritropoyetina, así como el efecto protector de la hormona han sido determinados en distintos tejidos y líneas celulares.

Por lo tanto, los hallazgos de este trabajo podrían permitir una mejor comprensión de la señalización desencadenada por la activación celular por eritropoyetina, no solo en células eritroides sino también en aquellas de origen no eritroide.


Daniela E. Tittori


Alicia Nesse

BIBLIOGRAFÍA

- BOSMAN GJ, BARTHOLOMEUS IG, DE MAN AJ, VAN KALMTHOUT PJ, DE GRIP WJ. Erythrocyte membrane characteristics indicate abnormal cellular aging in patients with Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 12:13-18, 1991.
- BREWER GJ, TARLOV AR, ALVING AS. The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis, *J Am Med Assoc* 180:386-388, 1962.
- BUCHET JP, LAUWERYS R, HASSOUN A, DRATWA M, WENS R, COLLART F, TIELEMANS C. Effect of aluminum on porphyrin metabolism in hemodialyzed patients, *Nephron* 46:360-363, 1987.
- BUSLER WR, Aluminum compounds: Aluminates. En: KIRK RE, OTHMER DF, GRAYSON M, ECKROTH D (eds.), *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, vol 2, pp 197-202. John Wiley & Sons, New York, 1979.
- BUYS SS, KUSHNER JP, Hematologic effects of aluminum toxicity. En: GITELMAN HJ (ed.), *Aluminum and Health. A Critical Review*, pp 235-256. Marcel Dekker, New York, 1989.
- CAMPBELL A, PRASAD K, BONDY S. Aluminum-induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma, *Free Radical Biol Med* 26:1166-1171, 1999.
- CARROLL M, ZHU Y, D'ANDREA AD. Erythropoietin-induced cellular differentiation requires prolongation of the G1 phase of the cell cycle, *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2869-2873, 1995.
- COX PA. *The Elements on Earth. Inorganic Chemistry in the Environment*. Oxford University Press, Oxford, 1995.
- CROSBY WH, FURTH FW. A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine, *Blood* 11:380-383, 1956.
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- DACIE JV, LEWIS SM. *Practical Haematology*. J y A Churchill Livingstone, Londres, 1995.
- DE BROE ME, D'HAESE PC, ELSEVIERS MM, CLEMENT J, VISSER WJ, van de VYVER FL, Aluminium and end-stage renal failure. En: DAVISON AM (ed.), *Nephrology. Proceedings of the Xth International Congress of Nephrology*, vol II, pp 1086-1116. Baillière Tindall, Londres, 1988.
- DEISS A, Destruction of erythrocytes. En: LEE G R, BITHELL TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th edition, pp 195-222. Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania, 1993.
- DI PAOLO N, MASTI A, COMPARINI I.B, GAROSI G, DI PAOLO M, CENTINI F, BRARDI S, MONACI G, FINATO V. Uremia, dialysis and aluminium, *Int J Artif Organs* 20:547-552, 1997.
- DONATO H, VAIN N, RENDO P. Tratamiento con eritropoyetina humana recombinante en período neonatal: indicaciones y controversias, *Arch Arg Pediatr* 94:28-45, 1996.
- DRÜEKE T, LACOUR B, TOUAM M, JUCQUEL JP, PLACHOT JJ, COURNOT-WITMER G, GALLE P. Effect of aluminum on hematopoiesis, *Kidney Int* 29 (Suppl 18): s45-s48, 1986a.
- DRÜEKE T, TOUAM M, LACOUR B. Aluminum-induced microcytic anemia in experimental chronic renal failure, *Nefrología* 6:67-69, 1986b.
- DRÜEKE TB, JOUHANNEAU P, BANIDE H, LANCOUR B, YIOU F, RAISBECK G. Effects of silicon, citrate and the fasting state on the intestinal absorption of aluminum in rats, *Clin Sci* 92:63-67, 1997.

DZANDU JK, DEH ME, BARRATT DL, WISE GE. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique, *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1733-1737, 1984.

ELINDER C-G, AHRENGART L, LIDUMS V, PETTERSSON E, SJÖGREN B. Evidence of aluminium accumulation in aluminium welders, *Br J Ind Med* 48:735-738, 1991.

ELLIS HA, MCCARTHY JH, HERRINGTON J. Bone aluminium in haemodialysed patients and in rats injected with aluminium chloride: Relationship to impaired bone mineralisation, *J Clin Pathol* 32:832-844, 1979.

ESCHBACH JW, ADAMSON JW. Anemia of end-stage renal disease (ESRD), *Kidney Int* 28:1-5, 1985.

ESCHBACH JW, EGRIE JC, DOWNING MR, BROWNE JK, ADAMSON JW. Correction of anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Result of a combined phase I and II clinical trial, *N Engl J Med* 316:73-78, 1987.

ESCHBACH JW. The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin, *Kidney Int* 35:134-148, 1989.

EXLEY C, BIRCHALL JD. The cellular toxicity of aluminium. *J theor Biol* 159:83-98, 1992.

Exley C (Ed.). *Aluminium and Alzheimer's disease. The science that describes the link.* Elsevier, Amsterdam, 2001.

FATEMI SJA, KADIR FHA, MOORE GR. Aluminium transport in blood serum. Binding of aluminium by human transferrin in the presence of human albumin and citrate, *Biochem J* 280:527-532, 1991.

FEIRBANKS G, STECK TL, WALLACH DF. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry* 10:2606-2617, 1971.

FISHER JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update, *Exp Biol Med* 228:1-14, 2003.

FLAREND R. Absorption of aluminum from antiperspirants and vaccine adjuvants. En: EXLEY C (ed.), *Aluminium and Alzheimer's disease. The science that describes the link.* Elsevier, Amsterdam, 2001.

FRASER JK, LIN F, BERRIDGA MV. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythrolukemic cell line K562, *Blood* 71:104-109, 1988.

GANROT PO. Metabolism and possible health effects of aluminium, *Environ Health Perspect* 65:363-441, 1986.

GARBOSSA G, GUTNISKY A, NESSE A. The inhibitory action of aluminum on mouse bone marrow cell growth. Evidence for an erythropoietin- and transferrin-mediated mechanism, *Miner Electrolyte Metab* 20:141-146, 1994.

GARBOSSA G, GUTNISKY A, CASTRO ME, RIZZO N, NESSE A. Depressed erythroid progenitor cell activity in aluminium-overloaded mice, *Miner Electrolyte Metab* 22:214-218, 1996.

GARBOSSA G, GÁLVEZ G, CASTRO ME, NESSE A. Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 1. Impairment of erythropoiesis, *Human Exper Toxicol* 17:312-317, 1998a.

- GARBOSSA G, GÁLVEZ G, PÉREZ G, STRIPEIKIS J, TUDINO M, NESSE A. Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 2. Body distribution, *Human Exper Toxicol* 17:318-322, 1998b.
- GOICOECHEA M, MARTÍN J, DE SEQUERA P, QUIROGA JA, ORTIZ A, CARRENO V, CAMELO C. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodiálisis patients, *Kidney Int* 54:1337-1343, 1998.
- GORDON JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor, *Methods Enzymol* 201:477-82, 1991.
- GUO GW, LIANG YX. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis, *Brain Res* 888:221-226, 2001.
- GUO-ROSS S, YANG E, BONDY S. Elevation of cerebral proteases after systemic administration of aluminium, *Neurochem* 33:277-282, 1998.
- HÄGERSTRAND H, DANIELUK M, BOBROWSKA- HÄGERSTRAND M, HOLMSTRÖM T, KRALJ-IGLIC V, LINDQVIST C, NIKINMAA M. The lamprey (*Lampreta fluviatilis*) erythrocyte; morphology, ultrastructure, major plasma membrane proteins and phospholipids, and cytoskeletal organization, *Molecular Membrane Biology* 16:195-204, 1999.
- HAN J, HAN J, DUNN MA. Effect of dietary aluminum on tissue nonheme iron and ferritin levels in the chick, *Toxicology* 142:97-109, 2000.
- HARRIS WR, BERTHON G, DAY JP, EXLEY C, FLATEN TP, FORBS WF, KISS T, ORVIG C, ZATTA PF. Speciation of aluminum in biological system, *J Toxicol Environ Health* 48:543-568, 1996.
- HAY RJ. Cell line preservation and characterization. En: FRESHNEY RN (ed.) *Animal cell culture. A practical approach*. 2nd Edition, pp 95-148. Oxford University Press, New York, 1992.
- HEM JD. Geochemistry and aqueous chemistry of aluminum, *Kidney Int* 29 (Suppl 18): s3-s7, 1986.
- INABA M, YAWATA A, KOSHINO I, SATO K, TAKEUCHI M, TAKAKUWA Y, MANNO S, YAWATA Y, KANZAKI A, SAKAI J, BAN A, ONO K, MAEDE Y. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation, *J Clin Invest* 97:1804-1817, 1996.
- ISCOVE NN, SIEBER F, WINTERHALTER KH. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A, *J Cell Physiol* 83: 309-320, 1974.
- JELKMANN W. Renal erythropoietin: Properties and production, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 104:139-215, 1986.
- KAEHNY WD, HEGG AP, ALFREY AC. Gastrointestinal absorption of aluminum from aluminum-containing antacids, *N Engl J Med* 296:1389-1390, 1977.
- KAISER L, SCHWARTZ KA, BURNATOWSKA-HLEDIN MA, MAYOR GH. Microcytic anemia secondary to intraperitoneal aluminum in normal and uremic rats, *Kidney Int* 26: 269-274, 1984.
- KALANTAR-ZADEH K, MCALLISTER CJ, LEHN RS, LEE GH, NISSENSON AR, KOPPLE JD. Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients, *Am J Kidney Dis* 42:761-773, 2003
- KAY MM. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ, *Proc Nat Sci USA* 72:3521-3525, 1975.

- KAY MM, FLOWERS N, GOODMAN J, BOSMAN G. Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5834-5838, 1989.
- KENNEDY WL, ALPEN EL, GARCIA JF. Erythroid colony production in vitro as a function of exposure time to erythropoietin, *Blood Cells* 4:143-54, 1978.
- KOMATSU N, NAKAUCHI H, MIWA A, ISHIHARA T, EGUCHI M, MOROI M, OKADA M, SATO Y, WADA H, YAWATA Y, SUDA T, MIURA Y. Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: Dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival, *Cancer Res* 51:341-348, 1991.
- KOMATSU N, KIRITO K, KASHII Y, FURUKAWA Y, KIKUCHI J, SUWABE N, AMAMOTO M, MIURA Y. Cell-cycle-dependent regulation of erythropoietin receptor gene, *Blood* 89:1182-1188, 1997.
- KOSOWER NS. Altered properties of erythrocytes in the aged, *Am J Hematol* 42:241-247, 1993.
- KOURY MJ, BONDURANT MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells, *Science* 248:378-381, 1990.
- KRANTZ S. Erythropoietin, *Blood* 77:419-434, 1991.
- KREBS D, HILTON D. SOCS: physiological suppressors of cytokine signalling, *J Cell Sci* 113:2813-2819, 2000.
- LACOMBE C, MAYEUX P. Biology of erythropoietin, *Hematologica* 83:724-732, 1998.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685, 1970.
- LAPPIN TR, MAXWELL P, JOUNSTON PG. EPO's Alter Ego: Erythropoietin has multiple actions, *Stem Cells* 20:485-492, 2002.
- LATJTHA LG, GILBERT CW, GUZMAN E. Kinetics of haemopoietic colony growth, *British J Haematol* 20:343-354, 1971.
- LAURICELLA AM, GARBOSSA G, NESSE A. Dissimilar behaviour of lymph cells in response to the action of aluminium. In vitro and in vivo studies, *Int Immunopharmacol* 1:1725-1732, 2001.
- LAWSON AE, BAO H, WICKREMA A, JACOBS-HELBER SM, SAWYER ST. Phosphatase inhibition promotes antiapoptotic but not proliferative signaling pathways in erythropoietin-dependent HCD57 cells, *Blood* 96:2084-2092, 2000.
- LEE G R, The hemolytic disorders: General consideration. En: LEE G R, BITHELL TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN (eds.), *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th edition, pp 944-964. Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania, 1993.
- LIN FK, SUGGS S, LIN CH, BROWNE JK, SMALLING R, EGRIE JC, CHEN KK, FOX GM, MARTIN F, STABINSKY Z, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7580-7584, 1985.
- LOWRY OR, ROSEBOROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurements with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
- LOZZIO CB , LOZZIO BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 45: 321-334, 1975.

- LUKENS JN, Hereditary spherocytosis and other hemolytic anemias associated with abnormalities of the red cell membrane and cytoskeleton. En: LEE G R, BITHELL TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN (eds.), *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th edition, pp 944-964. Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania, 1993.
- LUKIW, WJ, KRISHNAN B, WONG L, KRUCK TPA, BERGERON C, CRAPPER McLACHLAN DR. Nuclear compartmentalization of aluminum in Alzheimer's disease (AD), *Neurobiol Aging* 13:115-121, 1992.
- MACDOUGALL IC, COOPER AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines, *Nephrol Dial Transplant* 17 suppl 11:39-43, 2002.
- MARTIN RB. The chemistry of aluminum as related to biology and medicine, *Clin Chem* 32:1797-1806, 1986.
- MARTYN CN, OSMOND C, EDWARDSON JA, BARKER DJP, HARRIS EC, LACEY RF. Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water, *Lancet* i:59-62, 1989.
- MCATEER JA, DAVIS J, Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. En: DAVIS JM (ed.), *Basic cell culture. A practical approach*, pp 93-148. Oxford University Press, New York, 1994.
- MCKINNEY M, ROBBINS M. Chronic atropine administration up-regulates rat cortical muscarinic m1 receptor mRNA molecules: assessment with the RT/PCR, *Brain Res Mol Brain Res* 12: 39-45, 1992.
- MCLEOD DL, SHREEVE MM, AXELRAD AA. Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies *in vitro*: Quantitative assay method for CFU-E, *Blood* 44:517-534, 1974.
- MEYER DJ, HARVEY JW. *Veterinary Laboratory Medicine, International and Diagnosis*. 2^o Edición. WB Saunders, Filadelfia, 1998.
- MIGLIACCIO AR, JIANG Y, MIGLIACCIO G, NICOLIS S, CROTTA S, RONCHI A, OTTOLENGHI S, ADAMSON JW. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the expression of the erythropoietin receptor gene in human erythropoietin-responsive cell lines, *Blood* 82:3760-3769, 1993.
- MIYAKE T, KUNG CK, GOLDWASSER E. Purification of human erythropoietin, *J Biol Chem* 252:5558-5564, 1977.
- MOHANDAS N, CHASIS JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids, *Semin Hematol* 30:171-192, 1993.
- MONETT FC, KENT RB, WEINER EJ, JARRIS RF JR, OUELLETTE PL, THORSON JA, ZELICK RD. Cell-cycle properties and proliferation kinetics of late erythroid progenitors in murine bone marrow, *Exp Hematol* 8:484, 1980.
- MONTENEGRO J, AGUIRRE R, SARACHO R, MOINA I, MARTÍNEZ I. Factors influencing serum aluminum in CAPD patients, *Clin Nephrol* 50:77-83, 1998.
- MOODY JR, LINDSTROM RM. Selection and cleaning of plastic containers for storage of trace element samples, *Anal Chem* 49:2264-2267, 1977.
- MORRISON M, GRANT W, SMITH HT, MUELLER TJ, HSU L. Catabolism of anion transport protein in human erythrocytes, *Biochem* 24:6311-6315, 1985.
- MULCAHY L. The erythropoietin receptor, *Sem Oncol* 28:19-23, 2001.

NAGY E, JOBST K. Aluminium dissolved from kitchen utensils, *Bull Environ Contam Toxicol* 52:396-399, 1994.

NAYAK P, CHATTERJEE AK. Differential response of certain brain phosphoesterases to aluminium in dietary protein adequacy and inadequacy, *Food Chem Toxicol* 39:587-592, 2001.

NAYAK P. Aluminum: Impacts and disease, *Environ Res* 89:101-115, 2002.

NELSON DA, DAVEY FR. Hematopoyesis. En: HENRY JB (ed.). *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. 9ª Edición, pp 623-640. Masson-Salvat Medicina, Barcelona, 1993.

NESE A, GARBOSSA G, STRIPEIKIS J, GÁLVEZ G, CASTRO ME, RIZZO N, LAURICELLA AM, GUTNISKY A. Aluminum accumulation in chronic renal failure affects erythropoiesis, *Nephrology*, 3:347-351, 1997.

NESTEL AW, MEYERS AM, PAIKER J, ROLLIN HB. Effect of calcium supplement preparation containing small amounts of citrate on the absorption of aluminium in normal subjects and in renal failure patients, *Nephron* 68:197-201, 1994.

OGAWA M, PARMLEY RT, BANK HL, SPICER SS. Human marrow erythropoiesis in culture. I. Characterization of methylcellulose colony assay, *Blood* 48:407-417, 1976.

OLIVIERI G, BRACK CH, MÜLLER-SPAHN F, STÄHELIN HB, HERRMANN M, RENARD P, BROCKHAUS M, HOCK C. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and Tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells, *J Neurochem* 74:231-236, 2000.

ORIA R, SÁNCHEZ L, HOUSTON T, HENTZE MW, LIEW FY, BROCK JH. Effect of nitric oxide on expression of transferrin receptor and ferritin on cellular iron metabolism in K562 human erythroleukemia cells, *Blood* 85:2962-2966, 1995.

PENNINGTON JA, SCHOEN SA. Estimates of dietary exposure to aluminium. *Food Addit Contam* 12:119-128, 1995.

PÉREZ G, GARBOSSA G, SASSETTI B, DI RISIO C, NESSE A. Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells, *J Inorg Biochem* 76:105-112, 1999.

PÉREZ G, GARBOSSA G, DI RISIO C, VITTORI D, NESSE A. Disturbance of cellular iron uptake and utilization by aluminium, *J Inorg Biochem* 87:21-27, 2001.

PÉREZ G, PREGI N, VITTORI D, GARBOSSA G, NESSE A. Interferencia del aluminio con el metabolismo del hierro. Estudio de receptores involucrados, *Medicina* 62:443, 2002

QUARLES LD, WENSTRUP RJ, CASTILLO SA, DREZNER MK. Aluminum-induced mitogenesis in MC3T3-E1 osteoblasts: potencial mechanism underlying neoosteogenesis, *Endocrinology* 128:2144-2151, 1991.

RECKER RR, BLOTCKY AJ, LEFFLER JA, RACK EP. Evidence of aluminum absorption from the gastrointestinal tract and bone deposition by aluminum carbonate ingestion with normal renal function, *J Lab Clin Med* 90:810-5, 1977.

ROBERT D, SMITH DJ. Erythropoietin: induction of synthesis to signal transduction, *J Mol Endocrinol* 12:131-149, 1994.

RODRÍGUEZ SUÁREZ C, SERRANO M, RODRÍGUEZ ROZA R, PERAL V, CANNATA JB. Fuentes de exposición al aluminio en la insuficiencia renal crónica, *Nefrología* 6:75-78, 1986.

- ROUYER-FESSARD P, LECOMTE MC, BOIVIN P, BEUZARD Y. Separation of red cell membrane proteins by urea-Triton-poliacrilamide gel electrophoresis in one- and two- dimensional systems, *Electrophoresis* 8:476-481, 1987.
- SALUSKY IB, FOLEY J, NELSON P, GOODMAN WG. Aluminum accumulation during treatment with aluminum hydroxide and dialysis in children and young adults with chronic renal disease, *N Engl J Med* 324:527-531, 1991.
- SAMBROOK J, RUSSELL D, Chapter 7: Extraction, purification, and analysis of mRNA from eukaryotic cells. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd. Ed., pp. 7.1-7.88. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001.
- SAMPSON EJ, NEEDHAM LL, PIRKLE JL, HANNON WH, MILLER DT, PATTERSON DG, BERNET JT, ASHLEY DL, HILL RH, GUNTER EW, PASCHAL DC, SPIERTO FW, RICH MJ. Technical and scientific developments in exposure marker methodology, *Clin Chem* 40:1376-1384, 1994.
- SANAI T, OKUDA S, ONOYAMA K, MOTOMURA K, OSATO S, HORI K, ISEKI K, FUJISHIMA M. Effect of different doses of aluminium hydroxide on renal deterioration and nutritional state in experimental chronic renal failure, *Miner Electrolyte Metab* 17: 160-165, 1991.
- SAWADA K, KRANTS SB, KANS JS, DESSYPRIS EN, SAWYER S, GLICK AD, CIVIN CI. Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin, *J Clin Invest* 80: 357-366, 1987.
- SAWYER ST, HANKINS WD. The functional form of erythropoietin receptor is a 78-kDa protein: Correlation with cell surface expression, endocytosis, and phosphorylation, *Proc Natl Acad USA* 90:6849-6853, 1993.
- SAWYER ST, JACOBS-HELBER SM. Unraveling distinct intracellular signals that promote survival and proliferation: study of erythropoietin, stem cell factor, and constitutive signaling in leukemic cells, *J Hematother Stem Cell Res* 9:21-29, 2000.
- SCHWARZ-BEN MEIR N, GLASER T, KOSOWER NS. Band 3 protein degradation by calpain is enhanced in erythrocytes of old people, *Biochem J* 275:47-52, 1991.
- SEIBERT FB, WELLS HG. The effects of aluminum on mammalian blood and tissues, *Arch Pathol* 8: 230-261, 1929.
- SHEETZ MP, SINGER SJ. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, *Proc Nat Acad Sci USA* 71:4457-4461, 1974.
- SHIMIZU R, KOMATSU N, MIURA Y. Dominant negative effect of a truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation: Possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrome, *Exp Hematol* 27:229-233, 1999.
- SILBERGELD EK, DAVIS DL. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease, *Clin Chem* 40:1363-1367, 1994.
- SILVA M, BENITO A, SANZ C, PROSPER F, EKHTERAEE D, NÚÑEZ G, FERNÁNDEZ-LUNA JL. Erythropoietin can induce the expression of Bcl-xL through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines, *J Biol Chem* 274:22165-22169, 1999.
- SKOL L, LUHOVY M, GUAN Y, PRCHAL JF, SEMEZAA GL, PRCHAL JT. Primary familial polycythemia: A frameshift mutation in erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to Epo, *Blood* 86:15-22, 1995.

- SMITH MA, HARRIS PL, SAYRE LM, PERRY G. Iron accumulation in Alzheimer's disease is a source of redox-generated free radicals, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9866-9868, 1997.
- SPIVAK JL. Erythropoietin: A brief review, *Nephron* 52:289-294, 1989.
- SPIVAK JL. Recombinant erythropoietin, *Annu Rev Med* 44:243-253, 1993.
- SPOFFORTH J. A case of aluminum poisoning, *Lancet* I:1301, 1921.
- STEPHENSON JR, AXELRAD AA, McLEOD DL, SHREEVE MM. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci* 68:1542-1546, 1971.
- STRYER L. *Biochemistry*. 4^o Edición. Editorial Reverté, Barcelona, 1996.
- SUI X, KRANTZ SB, ZHAO ZJ. Stem cell factor and erythropoietin inhibit apoptosis of human erythroid progenitor cells through different signalling pathways, *Br J Haematol* 110:63-70, 2000.
- SUWALSKY M, UNGERER B, VILLENA F, NORRIS B, CARDENAS H, ZATTA P. Interactions of Al(acac)₃ with cell membranes and model phospholipid bilayer, *J Inorg Biochem* 75:263-268, 1999.
- SUWALSKY M, UNGERER B, VILLENA F, NORRIS B, CARDENAS H, ZATTA P. Effects of AlCl₃ on toad skin, human erythrocyte, and model cell membranes, *Brain Res Bull* 55:205-210, 2001.
- SUWALSKY M, NORRIS B, KISS T, ZATTA P. Effects of Al(III) speciation on cell membranes and molecular models, *Coordination Chemistry Reviews* 228:285-295, 2002.
- TANNER MJA. Molecular and cellular biology of erythrocyte anion exchanger (AE1), *Semin Hematol* 30:34-57, 1993.
- TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.
- TRAPP GA. Plasma aluminum is bound to transferrin, *Life Sci* 33:311-316, 1983.
- TRAPP GA. Interactions of aluminum with cofactors, enzymes, and other proteins, *Kidney Int* 29 (Suppl 18): s12-s16, 1986.
- TSOU VM, YOUNG RM, HART M, VANDERHOOF JA. Elevated plasma aluminum levels in normal infants receiving antacids containing aluminum, *Pediatrics* 87:148-151, 1991.
- UDUFA KB, LIPSCHITZ DA. Studies on the kinetics of the erythroid colony-forming cell, *Exper Hematol* 14:343-350, 1986.
- VAN RENSBURG SJ, CARSTENS ME, POTOCNIK FCV, VAN DER SPUY G, VAN DER WALT BJ, TALJAARD JJF. Transferrin C2 and Alzheimer's disease: another piece of the puzzle found?, *Med Hypotheses* 44: 268-272, 1995.
- VENTURINI M, BERTHON G. Aluminum speciation studies in biological fluids. Part 2. Quantitative investigation of aluminum-citrate complexes and appraisal of their potential significance *in vivo*, *J Inorg Biochem* 37:69-90, 1989.
- VERDIER F, CHRÉTIEN S, MULLER O, VARLET P, YOSHIMURA A, GISELBRECHT S, LACOMBE C, MAYEUX P. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation, *J Biol Chem* 273:28185-2819, 1998.

- VERDIER F, WALRAFEN P, HUBERT N, CHRÉTIEN S, GISSELBRECHT S, LACOMBE C, MAYEUX P. Proteasomes Regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors, *J Biol Chem* 275:18375-18381, 2000.
- VIVES CORRONS J. Estructura de la membrana eritrocitaria y clasificación de sus trastornos. En: López Borrascá A (ed.), *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*, Volumen I, pp 301-312. Ediciones Universidad Salamanca, Salamanca, 1992.
- WEISS G, HOUSTON T, KASTNER S, JOHRER K, GRÜNEWALD K, BROCK JH. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells, *Blood* 89:680-687, 1997.
- WICKREMA A, KRANTZ SB, WINKELMANN JC, BONDURANT MC. Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells, *Blood*. 80:1940-1949, 1992.
- WILHELM M, HÖHR D, ABEL J, OHNESORGE FK. Renal aluminum excretion, *Biol Trace Element Res* 21:241-245, 1989.
- WILHELM M, JÄGER DE, OHNESORGE FK. Aluminium toxicokinetics, *Pharmacol Toxicol* 66:4-9, 1990.
- WILLS MR, SAVORY J. Aluminium poisoning: Dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia, *Lancet* ii:29-34, 1983.
- WILSON JW, POTTEN C. Morphological recognition of apoptotic cells. En: Studzinski G (ed.), *Apoptosis. A practical approach*, pp 19-38. Oxford University Press, New York, 1999.
- WITTHUHN BA, QUELLE FW, SILVENNOINEN O, YI T, TANG B, MIURA O, IHLE JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin, *Cell* 74:227-36, 1993.
- WOJCHOWSKI D, GREGORY R, MILLER C, PANDIT A Y FIRCHER T. Signal transduction in the erythropoietin receptor system, *Exp Cell Res* 253:143-156, 1999.
- WORTHINGTON RE, BOSSIE-CODREANU J, VAN ZANT G. Quantitation of erythroid differentiation in vitro using a sensitive colorimetric assay for hemoglobin, *Exp Hematol* 15:85-92, 1987.
- XIE CX, YOKEL RA. Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminum and iron concentrations, *Arch Biochem Biophys* 327:222-226, 1996.
- YOUSSEFIAN H, LONGMORE G, NEUMANN D, YOSHIMURA A, LODISH HF. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor, *Blood* 81:2223-2236, 1993.
- ZAMAN K, DABROWSKI Z, MISZTA H. Effects of aluminium on erythroidal cells in bone marrow in rats, *Folia Histochem Cytobiol* 28:61-68, 1990.
- ZHANG M, SUN S, BELL L, MILLER B. NF- κ B transcription factors are involved in normal erythropoiesis, *Blood* 91:4136-4144, 1998.

