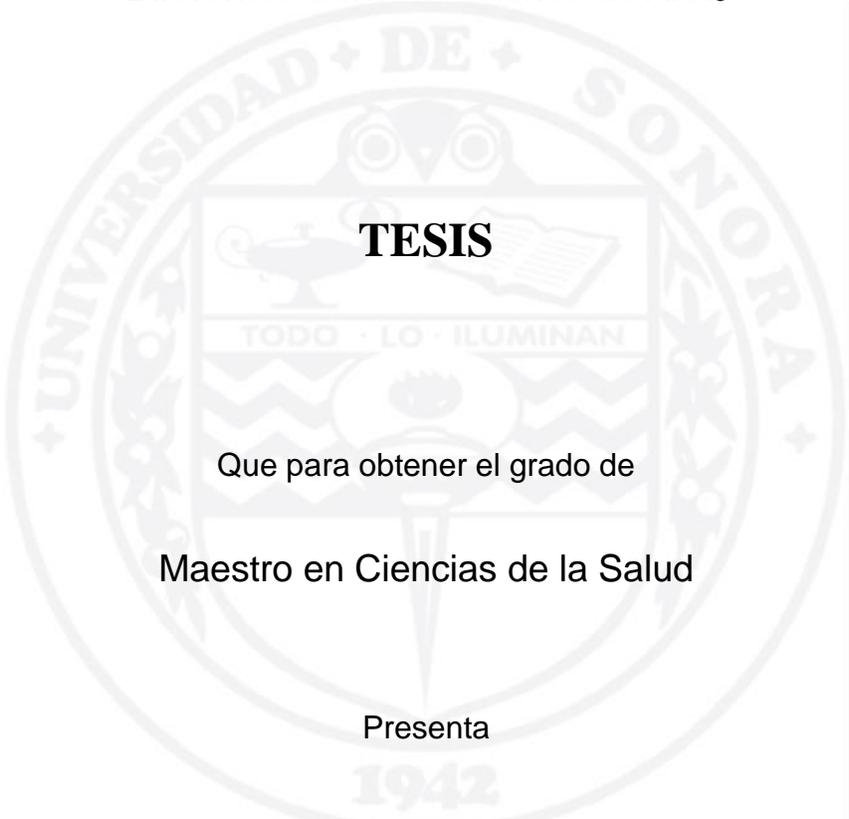


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Alteraciones Hematológicas en Ratas Sprague Dawley Expuestas a
Diferentes Concentraciones de $AlCl_3$



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Jeanette Guadalupe Arredondo Damián

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



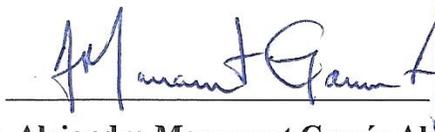
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Jeanette Guadalupe Arredondo Damián**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



M.C. Alejandro Monserrat García Alegría

Presidente



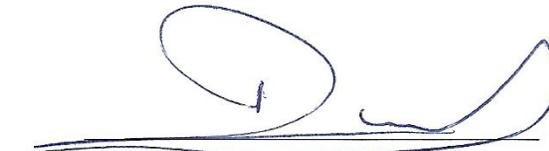
Dr. Eduardo Ruiz Bustos

Secretario



Dr. Agustín Gómez Álvarez

Sinodal



M.C. Antonio Rascón Careaga

Sinodal

A Dios, por nunca abandonarme.

A mi querido comité encabezado por el Dr. Alejandro Monserrat García Alegría por impartir su sabiduría, tener paciencia y ser una guía en todo momento. Al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, Dr. Agustín Gómez Álvarez y M.C. Antonio Rascón Careaga por su comprensión e infinita disponibilidad agradeciéndoles el magnífico equipo que me brindaron. Al Q.B. Leonardo Llanes Morales, por su apoyo y consejos incondicionales convirtiéndose en un amigo para toda la vida.

A la Universidad de Sonora por darme la oportunidad de conocer más. Al M.C. Rafael Canett Romero por el conocimiento otorgado y su valiosa cooperación en todo momento. A Alba Valenzuela por permitirme formar un excelente dueto de trabajo y acompañarme en cuanta dificultad se presentaba.

A mis padres Gloria y Francisco por ser la base de mi vida, estando tanto en los fallos como en los aciertos, teniéndome siempre cariño y paciencia para cuanta idea se me ocurría. A mi hermano Jesús, ya que sin su apoyo nunca pudiese haber llevado a cabo este proyecto.

A Abdiel Valenzuela, Alicia Gortárez, Aline Gil, Carmen Reyes, Carolina Figueroa, Karen Sotelo, Michel Ruiz, Sara Aguirre, Selene Millán, Shain Zúñiga y Valeria Cruz por acompañarme en este camino de años.

Al team biomédicas Astrid Ramírez, Gabriela Zubiata y Luis Vazquez por permitirme conocerlos y compartir grandes momentos con ustedes.

A mis queridos Alejandro Camacho, David Nicolás, Javier Valdéz, Lamberto León, Luis Carlos Romo, Miguel Ángel García, Nery Servín, Óscar Sandoval y Roberto Cerecer, por alentarme en todo aspecto de la vida.

A todo aquel que me haya impulsado a mejorar cada día con sus palabras, acciones y buenos deseos.

Agradezco de todo corazón a mis hijas Sprague Dawley por ser las mejores, brindarme alegrías y aprendizajes, pero, sobre todo, por soportarme tantos meses. Gracias a ustedes valoro y respeto aún más la vida de todo ser.

Finalmente agradezco a la vida, por permitirme ver lo hermosa que es y amarle aún más.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme acercarme más a él.

A mi familia, ya que cuanto haga en esta vida será siempre para el beneficio de nosotros cuatro.

Dios es nuestro refugio y fortaleza, socorro siempre en momentos de angustia. Por eso, si hay temblor no temeremos, o si al fondo del mar caen los montes; aunque sus aguas rujan y se encrespen y los montes a su ímpetu retiemblen.

Salmo 46:1-3.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
OBJETIVOS.....	ix
Objetivo General.....	ix
Objetivos Específicos.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Aluminio.....	4
Vías de Exposición.....	4
Oral.....	4
Cutánea.....	6
Respiratoria.....	8
Coadyuvantes.....	8
Vías de Excreción.....	8
Interacción de Aluminio con Componentes Biológicamente Importantes.....	9
Estrés Oxidativo y Daño a la Célula.....	10
Peroxidación Lipídica.....	11
Interacción con Hierro y Transporte.....	13
Transferrina.....	13
Citrato.....	13
Acumulación y Efectos en Sistemas.....	14

Tejido Mamario.....	14
Sistema Nervioso.....	14
Sistema Urinario.....	15
Tejido Óseo.....	15
Interacción con el Sistema Hematopoyético.....	17
Transporte.....	17
Eritrocitos.....	20
Efectos en los Componentes Hematológicos.....	21
Hemoglobina.....	22
Ferritina.....	22
Capacidad Total de Fijación de Hierro.....	22
Leucocitos.....	22
Plaquetas.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Diseño del Estudio.....	24
Condiciones de Manejo.....	24
Animales.....	24
Manejo.....	24
Condiciones Bioéticas.....	24
Diseño Experimental.....	27
Tratamientos.....	27
Preparación de Soluciones.....	28
Reactivos Utilizados.....	28
Solución Salina Fisiológica 0.9 %.....	28
Soluciones de AlCl ₃	28

Administración de $AlCl_3$ por Vía Intragástrica.....	28
Obtención de Muestras Biológicas.....	30
Ensayos.....	32
Determinación de la Concentración de Aluminio.....	32
Digestión de Muestras.....	32
Cuantificación de la Concentración de Aluminio.....	34
Linealidad.....	36
Exactitud.....	36
Determinación del Perfil Cinético de Hierro.....	37
Determinación de Hierro Sérico.....	37
Determinación de la Capacidad Total de Fijación de Hierro.....	37
Determinación de Saturación de Transferrina.....	40
Determinación de Ferritina.....	40
Citometría Hemática.....	42
Análisis Diferencial de Frotis Sanguíneo.....	43
Pruebas citoquímicas.....	45
Fosfatasa Alcalina.....	45
Peroxidasa.....	47
α -naftil acetato esterasa.....	48
Análisis Estadístico.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
Sujetos de Estudio.....	50
Ensayos.....	50
Determinación de la Concentración de Aluminio.....	50
Linealidad.....	50

Exactitud.....	52
Cuantificación de la Concentración de Aluminio.....	52
Determinación de Perfil Cinético de Hierro.....	54
Determinación de Hierro Sérico.....	54
Determinación de la Capacidad Total de Fijación de Hierro.....	56
Determinación de Saturación de Transferrina.....	56
Determinación de Ferritina.....	56
Citometría Hemática.....	58
Análisis Diferencial de Frotis Sanguíneo.....	61
Pruebas Citoquímicas.....	63
Fosfatasa Alcalina.....	65
Peroxidasa.....	65
α -naftil acetato esterasa.....	68
CONCLUSIONES.....	70
Recomendaciones.....	71
REFERENCIAS.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentración de aluminio ($\mu\text{g/L}$) para cada uno de los tratamientos experimentales.....	53
II. Perfil cinético de hierro: Hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro (TIBC), saturación de transferrina y ferritina.....	55
III. Citometría hemática: eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, amplitud de distribución eritrocitaria (RDW), conteo de leucocitos, plaquetas y volumen plaquetario medio (VPM).....	59
IV. Análisis diferencial de frotis sanguíneo.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Transporte de Al a través de las membranas biológicas (Exley, 2013).....	7
2. Peroxidación lipídica de la membrana (Realizada a partir de: Yuan y Lee, 2012).....	12
3. Interacción de hierro y aluminio con transferrina (Realizada a partir de Hardisson y col., 2017).....	19
4. Rata hembra de la variedad Sprague Dawley.....	25
5. Rack movable para ratas Sprague Dawley.....	26
6. Administración de $AlCl_3$ vía intragástrica.....	29
7. Extracción de sangre periférica por punción intracardiaca.....	31
8. Horno de Microondas MARSXpress CEM para digestión de muestras sanguíneas.....	33
9. Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo AAnalyst 400, con horno de grafito H6-900 (Perkin Elmer, 2012).	35
10. VITROS® DT 60 II para hierro sérico (Ortho-Clinical Diagnostics, 2004).....	38
11. Fotómetro de química clínica QC Diagnostics para la determinación de la capacidad total de fijación de hierro (SEAC, 1999).....	39
12. Espectrofotómetro Eli Read RT-2100C para determinación de	

ferritina por ELISA (KONTROLab ®, 2002)	41
13. Analizador hematológico Cell Dyn 1700 de Abbott Diagnostics para la realización de citometría hemática (Abbott Diagnostics, 1995).....	44
14. Curva de calibración para aluminio a partir de un estándar de aluminio de alta pureza por medio de EAAHG.....	51
15. Curva de calibración de ferritina.....	57
16. Análisis diferencial de extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de AlCl ₃ con tinción Wright-Giemsa. A) Grupo A, neutrófilo en banda; B) Grupo B, neutrófilo en banda; C) Grupo C, linfocito; D) Grupo D, neutrófilo; E) Grupo E, monocito.....	64
17. Extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de AlCl ₃ con tinción citoquímica fosfatasa alcalina y contra tinción Wright. A) Grupo A, linfocito; B) Grupo B, neutrófilo en banda; C) Grupo C, monocito; D) Grupo D, monocito; E) Grupo E, monocito.....	66
18. Extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de AlCl ₃ con tinción citoquímica peroxidasa y contra tinción Wright. A) Grupo A, neutrófilo en banda; B) Grupo B, linfocito; C) Grupo C, neutrófilo en banda; D) Grupo D, neutrófilo en banda; E) Grupo E, linfocito y neutrófilo en banda.....	67
19. Extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de AlCl ₃ con tinción citoquímica	

de α - naftil acetato esterasa contra tinción Wright. A) Grupo
A, neutrófilo en banda; B) Grupo B, neutrófilo en banda;
C) Grupo C, monocito; D) Grupo D, monocito; E) Grupo
E, monocito.....69

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las alteraciones hematológicas en ratas Sprague Dawley expuestas a diferentes concentraciones de aluminio en forma de $AlCl_3$ administrado por vía intragástrica.

Objetivos específicos

- Cuantificar la concentración de aluminio en sangre total mediante espectroscopia de absorción atómica, por horno de grafito.
- Determinar las alteraciones a nivel de perfil cinético de hierro (hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro, ferritina y saturación de transferrina) y citometría hemática en sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a diferentes concentraciones de aluminio como $AlCl_3$.
- Identificar alteraciones hematológicas en eritrocitos, leucocitos y plaquetas mediante análisis diferencial de frotis sanguíneo con tinción Wright-Giemsa así como marcadores citoquímicos.

RESUMEN

El aluminio es el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre, cuyo uso se ha incrementado en los últimos años. Se puede encontrar en el aire, agua, en alimentos frescos o enlatados, artículos de cuidado personal, entre otros. Es potencialmente tóxico y biológicamente reactivo, sin embargo, se desconoce una función biológica necesaria para los animales. Su toxicidad depende de su solubilidad, ruta de entrada, concentración y tiempo de exposición. El aluminio tiende a acumularse en ciertos órganos como cerebro, senos, riñones, hígado y huesos donde produce efectos nocivos para el órgano. Se le ha relacionado con afectaciones como Alzheimer, cáncer de mama, insuficiencia renal, osteomalacia y anemia microcítica. Sin embargo, a nivel hematológico no solamente se le relaciona con anemia, sino también con alteraciones significativas en la membrana de eritrocitos debido a diversos factores como estrés oxidativo, causal de daño a proteínas de membrana, peroxidación lipídica, alteración en la homeostasia de calcio, entre otros. Además, se le relaciona con interferir en el metabolismo del hierro por medio de su interacción con hemoglobina, transferrina y ferritina. En cuanto a leucocitos y plaquetas hasta el momento solamente se conoce el aumento y disminución respectivamente debido a la exposición de aluminio; sin embargo, no se han estudiado con un mayor énfasis ambas líneas celulares. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar las alteraciones hematológicas en ratas hembra de la variedad Sprague Dawley expuestas a tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) (0, 10, 20, 30, y 40 mg/Al por kg peso corporal) administrado por vía intragástrica a cinco grupos de cinco ratas durante un periodo de 90 días, determinando la presencia de aluminio dentro de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) por medio de espectroscopía de absorción atómica en la modalidad de horno de grafito, previa digestión ácida de las muestras, evaluar las posibles alteraciones en los componentes de dichas células por medio de citometría hemática y perfil cinético de hierro además de

diferencial de frotis sanguíneo, y, utilizar pruebas citoquímicas como fosfatasa alcalina, peroxidasa y α -naftil acetato esterasa para determinar si aluminio puede producir alguna alteración hematológica no tomada en cuenta con anterioridad. En base a los resultados obtenidos se determinó que aluminio bajo las condiciones administradas no provoca una alteración significativa en los parámetros evaluados. Sin embargo, se recomienda realizar un estudio con aluminio con diferente solubilidad, a mayores concentraciones y/o mayor tiempo de exposición.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia o la sobreexposición a diversos elementos tiene efectos notables en la salud humana. El efecto de un elemento está determinado por varias características que incluyen la absorción, el metabolismo y el grado de interacción con los procesos fisiológicos (Abbaspour y col., 2014). El aluminio no es un elemento esencial para los organismos vivos de los ecosistemas y se ha encontrado que es un agente tóxico (Torrellas, 2012). Lo podemos encontrar en diferentes formas, como aluminio metálico (Al^{3+}), óxido de aluminio (Al_2O_3), hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) y en sus sales solubles (Fulgenzi y col., 2015).

Se ha reportado que el aluminio ingresa al organismo a través de diversas formas como los alimentos, utensilios para cocinar o almacenar alimentos, el aire, el agua para consumo, antiácidos, aspirina, vacunas, productos de cuidado personal, aire contaminado por partículas de aluminio en industrias donde lo manejan, entre otros (Borowska y Brzóška, 2015; Farasani y Darbre, 2015; Hardisson y col., 2017; Klotz y col., 2017). Se ha estimado que el consumo de aluminio oscila entre 100 y 150 mg/Al por día (U.S. Department of Health and Human Services, 2008), siendo la ingesta semanal tolerable establecida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) de 1 mg de aluminio/kg de peso corporal (EFSA European Food Safety Authority, 2008). Ante esto se ha sugerido la disminución de la ingesta semanal tolerable provisional, la reducción de la contaminación de aluminio en soluciones de nutrición parenteral, la justificación de la adición rutinaria de aluminio a las vacunas y la armonización de los límites de exposición ocupacional para las sustancias de aluminio (Fulgenzi y col., 2015).

Las consecuencias tóxicas de la exposición a aluminio están relacionadas con la desregulación de otros metales o iones esenciales, deposición de precipitados de aluminio insoluble en tejidos vulnerables, proteínas, lípidos o interacciones nucleóticas que resultan en alteraciones conformacionales y estructurales, agregación y alteraciones funcionales (Maya y col., 2016).

El aluminio afecta el sistema nervioso, hematopoyético y esquelético, causando encefalopatía por hemodiálisis, anemia, aluminosis, osteomalacia y osteoporosis, entre otros efectos adversos para la salud (Rodríguez y Mandalunis, 2018). En huesos la toxicidad por aluminio se relaciona con la osteoporosis y la osteomalacia. El aluminio interfiere en el funcionamiento de la actividad osteoblástica o puede reemplazar directamente al calcio en los cristales de apatita y, por lo tanto, causar un defecto en la estructura cristalina de la hidroxilapatita (Rao y Kumar, 2015).

En el sistema hematopoyético, aluminio interfiere con la homeostasis del hierro y dificulta el metabolismo celular (Pandey y Jain, 2013). Aluminio también favorece la generación de un entorno oxidativo debido a su capacidad para crear un depósito de hierro lábil e interactuar con los lípidos de la membrana (Patel y Ramavataram, 2012). Los iones de aluminio reemplazan a hierro y magnesio (Mg^{2+}), lo que resulta en la disminución de hierro en ferritina (Skarabahatava y col., 2015). Los iones que son liberados a partir de complejos biológicos debido al aluminio, pueden catalizar al hidrógeno por descomposición del óxido a un radical hidroxilo. Esta alta reactividad al radical hidroxilo es capaz de iniciar la peroxidación lipídica (Maya y col., 2016). Lo anterior, provoca una disminución en la fluidez de la membrana de los eritrocitos al estimular las alteraciones morfológicas y funcionales (Alkan y col., 2019).

La correcta interacción entre los componentes de membrana la hace elástica y suave, proporcionando flexibilidad y deformabilidad al eritrocito, las cuales son características muy importantes para que el eritrocito mantenga su

integridad estructural y forma original protegiéndolo del medio que lo rodea. Esta interacción es metabólicamente activa y ocurre en presencia, entre otros factores, de adenosín trifosfato (ATP) (Farag y Alagawany, 2018). Al^{3+} puede competir con Mg^{2+} , interfiriendo en la unión con ATP o GTP (guanosín trifosfato) (Cardiano y col., 2018).

No existe solamente un mecanismo para explicar todos los efectos sistémicos del aluminio. Uno de ellos consiste en la lesión de células inducidas por radicales libres en la toxicidad por aluminio, otro son cambios en la membrana y biomoléculas agregadas, y, como se ha mencionado con anterioridad, el proceso de peroxidación de lípidos en la membrana celular (Geyikoglu y col., 2012).

Todos los mecanismos mediante los cuales aluminio puede interactuar con el organismo producen alteraciones o cambios ya sea en el conteo de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, alteraciones morfológicas en ellos, además de cambios en hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, volumen plaquetario medio, entre otros (Geyikoglu y col., 2012; Osman y col., 2012; Manisha y col., 2013). En la mayoría de los estudios no se tienen mayores análisis (además de la serie eritrocitaria) en los parámetros de la serie leucocitaria ni plaquetaria. Con base en lo anterior, y con la intención de indagar más en las consecuencias hematológicas de la exposición al aluminio, se realizó el presente estudio para evaluar las posibles alteraciones hematológicas producidas por la exposición de ratas Sprague Dawley a diferentes dosis de tricloruro de aluminio (AlCl_3) por medio del análisis sanguíneo, tanto en concentración de aluminio en el órgano, medición de los parámetros hematológicos correspondientes a la citometría hemática, análisis diferencial de frotis sanguíneo, evaluación del perfil cinético de hierro, y pruebas citoquímicas en sangre periférica de los animales.

ANTECEDENTES

Aluminio

El aluminio (Al) es el tercer elemento más abundante de la corteza terrestre seguido de oxígeno y el silicio. En la naturaleza se encuentra en forma de una roca sedimentaria llamada bauxita a partir de la cual se extrae aluminio para su utilización (Xue y col., 2016).

Su número atómico es 13 y tiene un isótopo estable, ^{27}Al , y un isótopo radioactivo de larga duración ^{26}Al . Al^{3+} es un catión con una fuerte carga, y un radio iónico (0.50 Å) similar al hierro (Fe^{3+}) (0.64 Å), magnesio (Mg^{2+}) (0.65 Å) y calcio (Ca^{2+}) (0.99 Å) (Kisnierienė y Lapeikaitė, 2015). El aluminio es extremadamente reactivo con el carbono y el oxígeno, dos de los elementos principales de la vida en la Tierra. La intervención humana ha hecho que el aluminio sea muy disponible para los sistemas biológicos, tanto que se dice vivimos en la era del aluminio. Por esta razón, el uso generalizado de aluminio biodisponible puede tener implicaciones inmensas y de gran alcance para la salud de los animales, incluyendo el humano (Shaw y Tomljenovic, 2013; Mujika y col., 2014).

La exposición excesiva a aluminio es inevitable, y su acumulación en sangre y tejidos humanos depende del tiempo, la duración, ruta y forma de exposición (Mohamed y Abd El-Moneim, 2017).

Vías de Exposición

Oral

La ingesta crónica de metales pesados puede provocar alteraciones graves en la salud, especialmente si su contenido en la dieta supera los niveles permitidos

(Kovacik y col., 2017). Todos los alimentos de forma natural contienen aluminio pero algunos en mayor cantidad (Buraimoh y Ojo, 2014).

Se han encontrado altos niveles de aluminio en diversos productos alimenticios como harina, pan, mezcla para pasteles, fórmulas lácteas para niños, pretzels, pasta, chocolate, cerveza, jugos de frutas, vino, agua, sopas, té, malta, y alimentos precocinados (Burrell y Exley, 2010; Stahl y col., 2011). Esto puede ser debido a que aluminio tiene una amplia gama de usos que incluyen utensilios de cocina y envases de alimentos como latas de bebidas, papel de aluminio, vasos de cerámica, entre otros (Chappard, 2016; Cakste y col., 2017; Ertl y Goessler, 2018). Los compuestos de aluminio, como el sulfato, fosfato, hidróxido y silicato, se utilizan en el procesamiento de alimentos (por ejemplo, aditivos alimentarios), tratamiento del agua entre otros (Veríssimo y Gomes, 2008).

Los aditivos alimentarios se consideran como la principal fuente dietaria de aluminio ya que se ha utilizado en el procesamiento de alimentos durante más de un siglo, como agente reafirmante, agente elevador, estabilizador, agente antiaglomerante, colorantes, entre otros. Ejemplos de aditivos alimentarios comunes que contienen aluminio son: el sulfato de aluminio y potasio ($KAl(SO_4)_2$), que se utiliza como agente reafirmante en las medusas y encurtidos; sulfato de aluminio y sodio ($AlNaO_8S_2$) en panadería; fosfato básico de sodio y aluminio ($Na_8Al_2(OH)_2(PO_4)_4$) como emulsionante en queso procesado; aluminosilicato de sodio ($AlNaO_6Si_2$) como agente anti aglomerante en mezclas de polvos y sales de Al utilizados como colorantes en dulces y recubrimientos (Wong y col., 2010; Stahl y col., 2011).

También se utiliza con frecuencia en medicamentos farmacéuticos en medicina humana y veterinaria como la aspirina (con glicinato de Al) (Crisponi y col., 2011), productos antidiarreicos y antiácidos (Ugbaja y col., 2017; Shrivastava y col., 2018). Cabe destacar que solo aproximadamente el 0.25% del aluminio en la dieta se absorbe en la circulación sistémica (Ivanovski, y col.,

2019). El aluminio se absorbe principalmente por el duodeno cercano y el estómago, pues a medida que disminuye el pH su solubilidad aumenta. La porción absorbida es una pequeña fracción de la ingerida, ya que el organismo bloquea su absorción. El silicio y calcio disminuyen la absorción de aluminio, mientras que el fluoruro y citrato la aumentan (Fernández-Maestre, 2014).

Cutánea

Existen diversos productos de uso diario que contienen aluminio, como los antitranspirantes (Bakir y Darbre, 2015), cosméticos, cremas corporales y protectores solares (Pineau y col., 2014). El uso diario de estos productos es una de las maneras por las cuales el aluminio puede ser absorbido a través de la piel, conduciéndose a los vasos sanguíneos y transportándose por el torrente hasta llegar a cerebro, hígado, riñón, seno, pulmón, entre otros, y acumularse en ellos (Borowska y Brzóška, 2015).

El transporte de aluminio aplicado por vía tópica, como un antitranspirante o un protector solar, implicaría una difusión pasiva por ruta tanto transcelular como paracelular (Exley, 2013). Existen cinco vías principales por las cuales el aluminio podría ser transportado a través de membranas celulares o epi/endotelios celulares. La primera (1) es por vía paracelular; seguido por (2) transcelular; (3) transporte activo; (4) canales; y (5) endocitosis adsorbente o mediada por receptores. Así mismo, existen cinco clases principales de formas de aluminio que podrían participar en estas rutas de transporte. Una de ellas es en forma de catión trivalente solvatado libre ($Al^{3+}_{(ac)}$); en forma de complejos de bajo peso molecular neutros solubles ($LMW-Al^0_{(aq)}$); complejos de alto peso molecular neutros solubles ($HMW-Al^0_{(aq)}$); complejos solubles de bajo peso molecular ($LMW-Al(L)_{n+/-}_{(aq)}$); por último, en forma de nano y micropartículas ($Al(L)_{n(s)}$) (Exley y Mold, 2015) (Fig. 1).

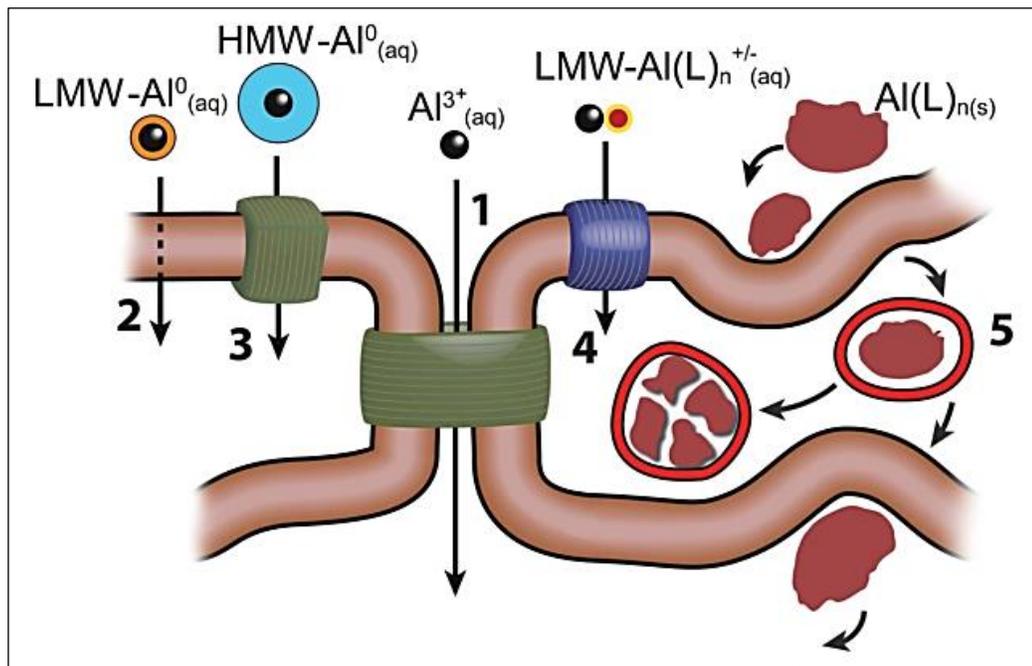


Figura 1. Transporte de Al a través de las membranas biológicas (Exley, 2013).

Respiratoria

Existen industrias que contaminan el ambiente exponiendo tanto animales, trabajadores como las poblaciones que residen alrededor, a la inhalación de partículas de aluminio en niveles más altos de lo normal (Adekunle y col., 2012). Pesticidas de fosforo de aluminio (Mashayekhian y col., 2016), el cigarro y todos los elementos que contiene desde el tabaco, el papel que lo rodea como en los filtros, son otras maneras en las cuales el aluminio puede ser absorbido a través de los pulmones, siendo precisamente la vía respiratoria la principal vía de exposición, sin embargo, el mecanismo por el cual el aluminio se traslada hasta el momento no es claro (Choupani y col., 2018; Alkan y col., 2019; Ivanovski, y col., 2019).

Coadyuvantes

En vacunas, los dos tipos principales de adyuvantes de aluminio que están disponibles comercialmente son el de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) y el hidroxifosfato de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$) (HogenEsch, 2013). El $\text{Al}(\text{OH})_3$, es la forma de adyuvante más común, inyectado por vía intramuscular y se puede absorber con una eficiencia de casi el 100%. El aluminio que llega subcutáneamente o por vía intramuscular proveniente de vacunas es elevado, y sus interacciones inmediatas en el lugar de la inyección son tan significativas, que administran aluminio biológicamente reactivo lo suficientemente rápido como para dar lugar a una citotoxicidad necrótica significativa, y con ello inflamación y muerte celular (Exley, 2016; Ivanovski, y col., 2019).

Vías de Excreción

La orina, el sudor y las heces fecales, en orden de importancia, son las vías por las cuales el exceso de aluminio sistémico es excretado del cuerpo (Minshall y col., 2014; Ivanovski, y col., 2019). El aluminio absorbido es eliminado rápidamente por los riñones en cantidades de 15 a 55 $\mu\text{g}/\text{día}$, pero cuando la

capacidad excretoria del riñón es excedida, una parte del aluminio se deposita en los tejidos, donde puede alcanzar niveles tóxicos (Fernández-Maestre, 2014). Pacientes con problemas renales son más propensos a tener padecimientos relacionados con la acumulación de aluminio (Veiga y col., 2013).

En el aspecto de la sudoración es importante destacar que al utilizar anitranspirantes a base de aluminio, no solamente se incrementa su exposición, sino también su acumulación ya que se bloquea una de las vías de excreción al impedir la sudoración (Minshall y col., 2014).

Se debe tomar en cuenta que dependiendo de la forma y los elementos a los cuales aluminio se encuentre unido va a depender la cantidad de absorción o excreción de éste (Glynn y Lingnell, 2019).

Interacción de Aluminio con Componentes Biológicamente Importantes

El aumento de las concentraciones de metales en la sangre tiene un impacto significativo en numerosos cambios bioquímicos y fisiológicos en el organismo (Massanyi y col., 2014). La toxicidad del aluminio es causada por la interrupción de la homeostasis de diversos elementos como hierro, magnesio y calcio, a los cuales imita en sus funciones biológicas y desencadena alteraciones bioquímicas (Fulgenzi y col., 2014).

Debido a la fuerte selectividad del intercambiador de cationes para los cationes trivalentes, el Al^{3+} reemplaza gradualmente a los cationes nutrientes bivalentes y monovalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y potasio (K^{+})) de sus sitios de intercambio. La entrada de aluminio en el citoplasma afecta la homeostasis de varios iones, como hidrógeno (H^{+}), K^{+} y Ca^{2+} . Los iones Al^{3+} y Mg^{2+} son hexahidratos, siendo el radio de aluminio hidratado (0.480 nm) y de magnesio (0.428 nm) notablemente similares, tanto así que el sistema de captación de magnesio o los sitios de unión de magnesio en las enzimas no distinguen adecuadamente entre los iones Al^{3+} y Mg^{2+} , haciendo que compitan por los

transportadores de membrana y los sitios de unión a metales en las enzimas. La tasa de intercambio de ligandos de magnesio es 105 veces más rápida que la de aluminio, y, por lo tanto, aluminio inhibe las enzimas con cofactores de magnesio. Un ejemplo de ello es en el adenosin trifosfato (ATP) (Kisnieriené y Lapeikaitė, 2015).

El ATP es utilizado por los eritrocitos para mantener la estabilidad osmótica y mantener las proteínas de la red esquelética submembrana, lo que mantiene la forma de la membrana y controla la deformación (Farag y Alagawany, 2018). Al^{3+} también puede competir con Ca^{2+} inhibiendo los procesos biológicos que implican un intercambio rápido de calcio; es debido a que el tipo de cambio para aluminio es 108 veces más lento que el de calcio (Kisnieriené y Lapeikaitė, 2015). Los cambios en la homeostasis del calcio y la fosforilación/desfosforilación de proteínas puede ser la explicación a la toxicidad celular del aluminio (De Sautu y col., 2018). En el caso de magnesio y su competencia con aluminio, ésta la pueden realizar interfiriendo en la unión a ATP y provocando cambios en la membrana del eritrocito (Cardiano y col., 2018).

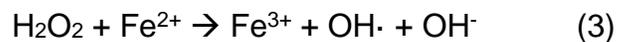
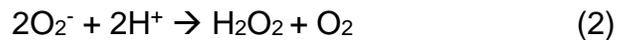
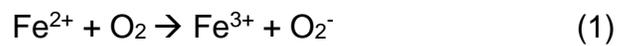
Estrés Oxidativo y Daño a la Célula

Los metales pueden desempeñar funciones importantes en el entorno redox debido a su capacidad catalítica para promover las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Iglesias-González y col., 2017). Las ERO son altamente tóxicas y pueden reaccionar con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, conduciendo a la muerte celular vía apoptosis o necrosis (Sivakumar y col., 2013; Maya y col., 2016).

El aluminio puede producir ERO a través de su interacción con el hierro el cual es un importante elemento traza del cuerpo y se encuentra en forma funcional en hemoglobina, mioglobina y enzimas citocromáticas con complejos de sulfuro de hierro (FeS). Al es capaz de desplazar al hierro, aumentando así el

contenido de hierro intracelular y promoviendo la reacción de Fenton (García-Medina y col., 2013; Pari y col., 2014).

Un ejemplo es hierro reaccionando con oxígeno para producir superóxido (O_2^-) (1), que mediante la dismutación conduce a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (2), el cual reacciona con hierro para formar radicales hidroxilo ($\cdot OH$) (3) (Vilchèze y col., 2013):



Peroxidación Lipídica

Los lípidos son más sensibles a alteraciones oxidativas por parte de las ERO. Los productos de la peroxidación de lípidos como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y la acroleína (marcadores de oxidación de lípidos), son químicamente reactivos y potencialmente tóxicos modificando moléculas esenciales como proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN). La peroxidación lipídica se usa como un estándar para el estrés oxidativo inducido por metales (Jan y col., 2015). MDA es una molécula bifuncional altamente reactiva que podría afectar varias funciones de la membrana al modificar la estructura de las proteínas de los eritrocitos y los fosfolípidos, lo que lleva a una disminución de la supervivencia y la muerte, por ejemplo, al inducir hemólisis (Farag y Alagawany, 2018). Debido a que aluminio induce el proceso de peroxidación lipídica en la membrana celular, puede producir cambios en la membrana (Türkez y col., 2010) (Fig. 2).

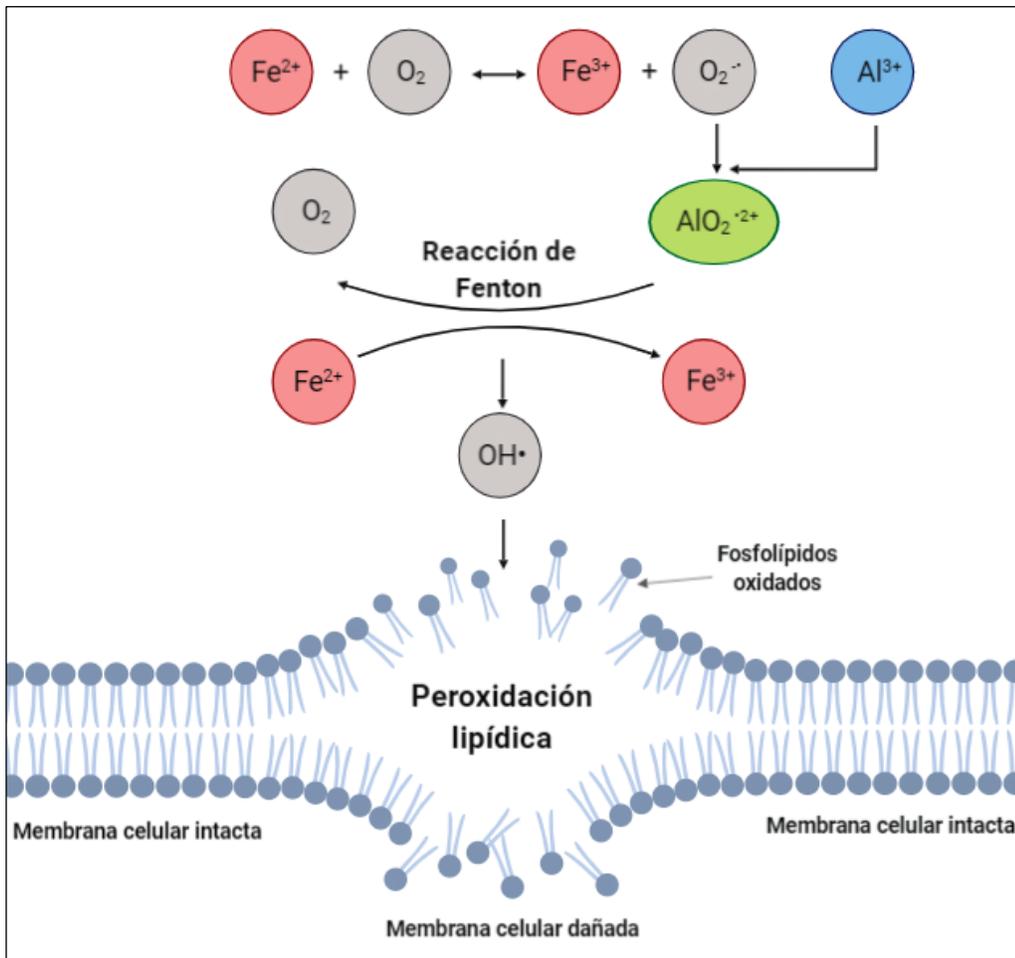


Figura 2. Peroxidación lipídica de la membrana (Realizada a partir de: Yuan y Lee, 2012).

Interacción con Hierro y Transporte

Transferrina. En circulación, el hierro se transporta a través de la transferrina, para el mantenimiento, regulación del transporte y captación de hierro. El suministro de hierro hacia la mayoría de las células requiere la unión de la transferrina diférrica a los receptores de la transferrina. El complejo es endocitado y un transportador metálico divalente (DMT-1) libera y transporta el hierro al citoplasma (Patel y Ramavataram, 2012; Awadallah, 2013).

Debido a que la constante de afinidad entre transferrina y hierro es continua, también lo es entre transferrina y aluminio. Cuando se tiene una elevación de aluminio con respecto a hierro, también hay un aumento en la cantidad de aluminio que se une a transferrina y, por consecuencia, menos hierro se une a transferrina. Esto conduciría a la disminución del transporte de hierro en el organismo (Zhang y col., 2011).

La cantidad de hierro es controlada en el sentido que se utiliza directamente en procesos metabólicos o es secuestrada por ferritina. La ferritina actúa como un depósito de almacenamiento que acepta hierro y permite su movilización cuando es necesario para la síntesis de hemoglobina, o como un cofactor de muchas reacciones enzimáticas (Patel y Ramavataram, 2012; Awadallah, 2013). Ferritina, además de almacenar hierro, tiene la capacidad de almacenar otros metales, entre ellos aluminio (De Sole y col., 2013). Entre menor es la concentración de hierro, mayor la absorción y acumulación de aluminio en ferritina, que, al mismo tiempo, la disminución de hierro es una de las consecuencias de la exposición a aluminio (Zhu y col., 2012).

Citrato. El porcentaje de Al asociado con citrato se estima es entre el 7 y el 8 %. El citrato reacciona con aluminio para formar un complejo soluble debido a la competencia que existe entre Al^{3+} y Ca^{2+} . La afinidad de unión del aluminio es mucho mayor y reemplaza fácilmente al calcio en tales complejos.

El intercambio entre aluminio y calcio causa una alteración de la integridad de las uniones de las células epiteliales intestinales, creando una vía paracelular para la absorción de complejos de aluminio-citrato solubles (Crisponi y col., 2012; Gupta, 2014).

Acumulación y Efectos en Sistemas

Tejido Mamario

La aplicación de antitranspirantes bajo el brazo conteniendo sales de aluminio, como clorhidrato de aluminio ($\text{Al}_2\text{Cl}(\text{OH})_5$) entre otras variantes, resultan ser los agentes antitranspirantes activos bloqueando los conductos del sudor en las axilas, precipitándose dentro de las glándulas sudoríparas ecrinas para producir aluminio insoluble. Éste obstruye la glándula y bloquea la secreción de sudor proveyendo una potencialmente alta y continua exposición en el área local del seno, y en particular para el cuadrante superior, la cual es una región con desproporcionadamente alta incidencia de cáncer de mama (Darbre y col., 2013; Pineau y col., 2014).

Por otra parte, existe una alta incidencia de tumores mamarios femeninos dependientes de hormonas donde aluminio tiene la capacidad de unirse al receptor de estrógeno e imita sus funciones. Debido a la activación de los receptores de estrógenos, la producción de óxido nítrico aumenta en la célula de forma significativamente alta, conduciendo a una limitación en su viabilidad e inclusive muerte celular (Darbre, 2016; Jennrich y Schulte-Uebbing, 2016).

Sistema Nervioso

El aluminio se ve relacionado con enfermedades neuronales ya que ejerce una toxicidad directa en células neurales humanas primarias e inducen la neurodegeneración, a través de un aumento en la acumulación de hierro y la producción de ERO provocando también daño al ADN (Fulgenzi y col., 2014). Se

han encontrado concentraciones patológicamente significativas en los cuatro lóbulos cerebrales, principales en el hipocampo. El contenido de aluminio es alto en los lóbulos occipital y parietal coincidiendo con una importante neuropatología relacionada con la enfermedad de Alzheimer (Mirza y col., 2016). Otras de las enfermedades neuronales a las que se relaciona aluminio es esclerosis lateral amiotrófica y demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (Yellamma y col., 2010).

Sistema Urinario

En pacientes con disminución renal se produce una incorrecta homeostasis de potasio, produciendo una retención progresiva de él (Lloret y col., 2013), lo cual comúnmente se contrarresta con la administración de aluminio como quelante de fosfatos y así reducir su acumulación. Sin embargo, la intoxicación por aluminio es un efecto secundario importante ya que también es excretado principalmente por la orina (Susantitaphong y col., 2014). Esta acumulación como consecuencia de la disminución de excreción renal y por el aumento de exposición a aluminio a su vez produce efectos en el aumento de acumulación de aluminio en otras áreas principalmente, en este caso, en tejido óseo, hígado, músculo y cerebro, produciendo diversos efectos, además de la acumulación en ellos (Crisponi y col., 2012; Tsai y col., 2018).

Tejido Óseo

La exposición crónica a aluminio podría reducir los niveles de los elementos minerales (calcio, magnesio, fósforo) en hueso y oligoelementos (hierro, zinc, cobre, manganeso, selenio, boro, estroncio, entre otros), conduciendo a pérdida ósea, particularmente en el hueso esponjoso (Li y col., 2011).

El ciclo del aluminio en huesos comienza con la transferencia de iones metálicos desde la transferrina y el citrato en el torrente sanguíneo hasta las

superficies óseas, donde el aluminio se adhiere. Dentro del esqueleto, los iones de aluminio se depositan primero en las superficies óseas, incluidas las superficies endostiales internas y periostales externas, las superficies trabeculares y la superficie de los canales vasculares que atraviesan los huesos compactos. Posteriormente, los iones de aluminio pueden transferirse a osteoclastos, grandes células multinucleadas óseas reabsorbibles o incorporarse a la matriz ósea. Se ha demostrado que los osteoclastos liberan aluminio a los macrófagos en la médula ósea. Los macrófagos podrían actuar como un almacenamiento temporal de iones de aluminio, antes de liberar el metal a citrato y/o transferir los iones metálicos a otras células, permitiendo que el aluminio vuelva a entrar al torrente sanguíneo (Crisponi y col., 2013).

Una de las patologías que produce aluminio en hueso es osteomalacia el cual, es un trastorno de baja remodelación ósea asociada a una mineralización anormal secundaria a una actividad disminuida de los osteoblastos. Esto generalmente se produce en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) terminal, donde aluminio actúa directamente disminuyendo la actividad de osteoclastos y la diferenciación de osteoblastos (Astudillo y col., 2016). El factor de crecimiento transformante b1 ((TGF-b1)/Smad) participa de manera importante en la regulación de la mineralización de osteoblastos. Aluminio inhibe la mineralización de osteoblastos y la vía de señalización de TGF-b1/Smad a nivel genético a su vez limitando la expresión de fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es un marcador de la mineralización de osteoblastos y la formación ósea. Participa en la mineralización de los osteoblastos al promover la formación de cristales de hidroxapatita. Aluminio reduce la actividad de fosfatasa alcalina, y como consecuencia se da la inhibición de la formación de cristales de hidroxapatita. La mineralización de osteoblastos es un proceso importante de la formación de hueso, y la mineralización aberrante afecta la formación del tejido, lo que finalmente conduce a la osteoporosis (Li y col., 2016; Sun y col., 2016).

Las deficiencias de calcio o magnesio pueden exacerbar los efectos del aluminio. La sobrecarga de aluminio conduce a la supresión de la hormona paratiroidea (PTH) y con respecto al hueso, puede estar asociada con alteración de la homeostasis del calcio. El aluminio también puede tener efectos negativos en la hematopoyesis y es causada por una deficiencia de hierro debido a aluminio. Se presenta un aumento de los niveles de transferrina libre, que posteriormente puede unirse al aluminio y competir por el receptor de transferrina, limitando aún más la cantidad de hierro disponible para la eritrogénesis (Krewski y col., 2007). Existen formas para tratar de revertir la acumulación de aluminio en huesos, uno de ellos es por medio de la utilización de quelantes, por ejemplo, deferoxamina. Una de las características de buen quelante de aluminio es debe ser capaz de movilizarlo y reducir su carga corporal (Crisponi y col., 2012).

Interacción con el Sistema Hematopoyético

Transporte

La sangre total es un medio extremadamente dinámico en términos de su flujo físico y movimiento en todo el cuerpo, además de la heterogeneidad de su composición. Este último tendrá implicaciones significativas para el transporte y destino del aluminio. En sangre existen compartimentos como las células, membranas, complejos solubles que incluyen péptidos, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos y ligandos inorgánicos, incluyendo hidróxido, fosfato, fluoruro y ácido silícico, los cuales pueden desempeñar un papel de transporte de aluminio debido a la propensión de estos elementos a unirse a aluminio (Exley y Mold, 2015).

El aluminio se puede encontrar ligado y transportado por la proteína de transporte de hierro-transferrina, o por medio de ligandos de bajo peso molecular tales como citrato, fosfato, catecolaminas o aminoácidos para la distribución de

aluminio en sangre y tejidos (Bragadin y col., 2004; Exley, 2013). Cerca del 90 % del aluminio se encuentra en un complejo con transferrina, la proteína transportadora de hierro (El Hage Chahine y col., 2012; Gupta, 2014). Alrededor del 10% del aluminio sérico está unido a especies de baja masa molecular, esta fracción está compuesta por complejos de aluminio-citrato, aluminio-fosfato (Al-PO_4^{3-}) y el ternario aluminio-citrato-fosfato cuyo porcentaje es individualmente variable y depende del estado de salud de los individuos. La captación de complejos de aluminio-transferrina produce efectos metabólicos diferentes de los observados después de la captación de complejos de aluminio-citrato, lo que sugiere que aluminio-transferrina podría secuestrar aluminio en compartimentos intracelulares diferentes de aluminio-citrato (Crisponi y col., 2012).

El hierro es un elemento crucial para el crecimiento y la supervivencia de casi todos los organismos vivos. Es uno de los componentes vitales de las proteínas que transportan oxígeno, hemoglobina y metahemoglobina (Jaishankar y col., 2014). El hierro se transporta en el suero unido a transferrina, la cual lo deposita en las células mediante una vía endocitótica que involucra al receptor de transferrina (Cheng y col., 2004). En el caso del aluminio, éste se puede unir a la molécula de transferrina gracias a su estado oxidativo, que es el mismo que el hierro sérico (Al^{3+} y Fe^{3+}) (Fig. 3). El complejo aluminio-transferrina, que se une a los receptores de transferrina, se encuentra dentro del citosol, donde experimenta una disminución del nivel de pH a 5.5 liberando así al aluminio del complejo (Hardisson y col., 2017).

El receptor de transferrina soluble es un marcador sensible para la deficiencia de hierro. Las concentraciones circulantes del receptor de transferrina soluble son proporcionales a la expresión celular del receptor de transferrina de membrana. La expresión celular del receptor de transferrina de membrana aumenta en asociación con la necesidad de hierro celular y de proliferación celular. El receptor de transferrina de membrana se expresa principalmente en la

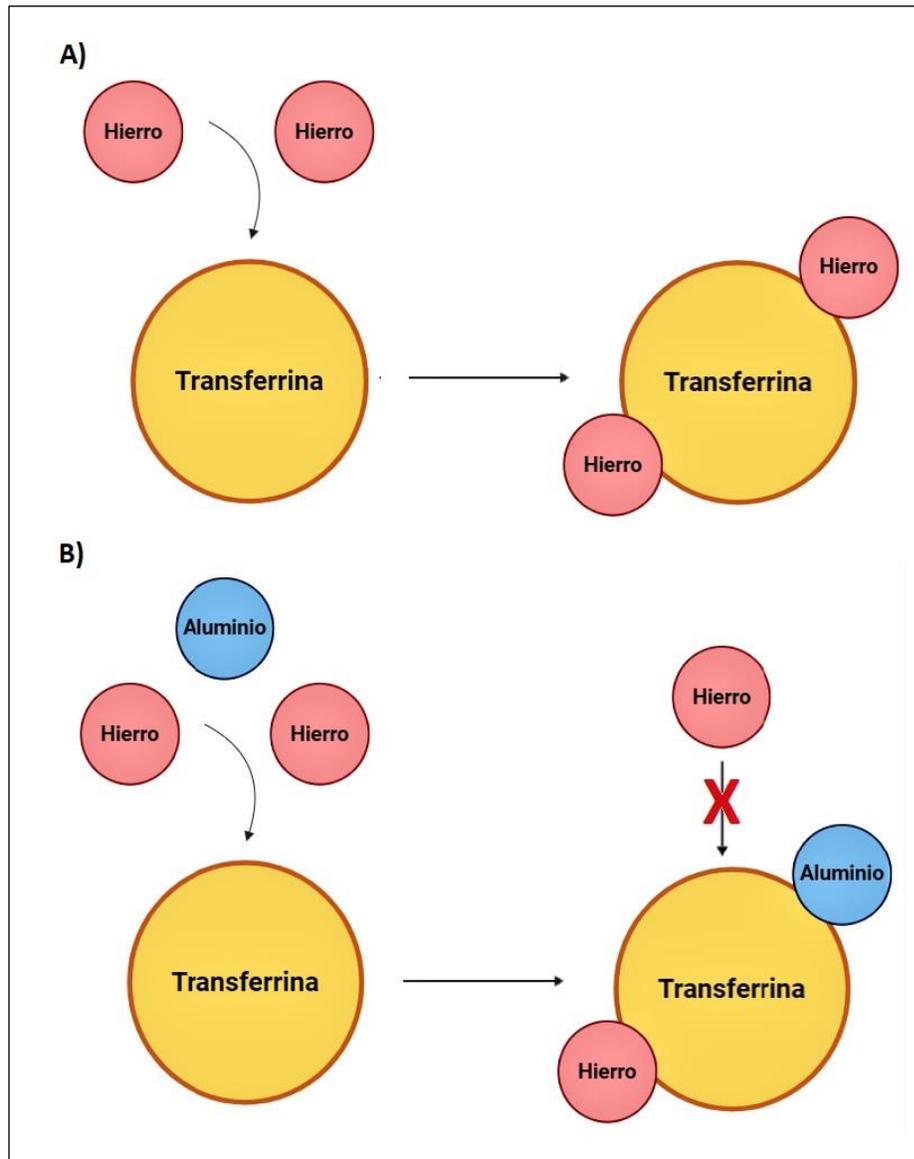


Figura 3. Interacción de hierro y aluminio con transferrina (Realizada a partir de Hardisson y col., 2017).

superficie de las células eritroides y libera hierro durante la proliferación y la síntesis de hemoglobina. Se ha demostrado que aluminio puede disminuir las concentraciones de receptor de transferrina soluble y del receptor de transferrina de membrana (Zhang y col., 2011).

La regulación ascendente de la expresión de receptor de transferrina celular se produce como resultado de un suministro inadecuado de hierro o de una mayor demanda celular de hierro, por lo que se puede detectar la elevación del receptor de transferrina soluble en el caso de anemia por deficiencia de hierro, talasemia y policitemia (Wiwanitkit, 2006).

La membrana plasmática de los eritrocitos es la responsable del mantenimiento de su forma (Girasole y col., 2012), no es una estructura estática, sino que es altamente dinámica, lo que le permite sufrir las extensas deformaciones necesarias para atravesar el lecho vascular y realizar su función principal de suministro de oxígeno. La compleja organización estructural de los diversos componentes de membrana del eritrocito es responsable de sus características únicas de deformabilidad extensa y estabilidad mecánica (Da Costa y col., 2016).

Eritrocitos

El aluminio puede producir tres efectos principales en los eritrocitos: disminución de la energía debido a alteración en el ATP; producción de estrés oxidativo y; choque osmótico. Como consecuencia de estos efectos se tiene la producción de ERO las cuales conducen a alteraciones en la morfología eritrocitaria, cambios en la conformación de proteínas, reticulación de proteínas, disminución de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, además de peroxidación lipídica (Farag y Alagawany, 2018; Alkan y col., 2019). Glutatión desempeña un papel en la protección de la viabilidad celular. Esta disminución en la protección contra el estrés oxidativo aumenta la

susceptibilidad de las células a un ambiente oxidativo adicional (Vota y col., 2012).

Las proteínas de membrana de los eritrocitos consisten principalmente en espectrina (subunidades α y β), anquirina (subunidades 2.1 y 2.2) banda 3, proteína 4 (subunidades 4.1 y 4.2), actina (banda 5) y gliceraldeído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PD), que son responsables de mantener la estructura y función de la membrana eritrocítica. La disminución de la expresión de las proteínas de la membrana daña la estructura de la membrana e inhibe las actividades de varias enzimas y receptores de proteínas, que son esenciales para la función de la membrana de los eritrocitos (Zhang y col., 2016).

Los eritrocitos pueden entrar a una etapa de muerte celular conocida como eriptrosis. Ésta se desencadena debido a la apertura de canales de cationes no selectivos permeables al calcio, el subsiguiente aumento de la concentración de calcio citosólico que es seguido por la contracción celular debido a la activación de los canales de potasio sensibles al calcio, y por la descomposición del orden de los fosfolípidos en la membrana celular con translocación de fosfatidilserina hacia la superficie de la célula (Vota y col., 2012; Lang y col., 2016). Fosfatidilserina en la superficie celular se une a los receptores de células fagocíticas con su consiguiente engullimiento y degradación. Este proceso puede desencadenar una de las patologías más importantes en los eritrocitos, la anemia, comprometiendo así el transporte de oxígeno en la sangre. Otras enfermedades que son asociadas a la eriptrosis es la sepsis, síndrome urémico hemolítico, IRC, talasemia β , deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y deficiencia de fosfatos (Lang y col., 2012).

Efectos en los Componentes Hematológicos

Uno de los efectos que produce aluminio en el sistema hematopoyético es la disminución de eritrocitos (Zhang y col., 2011), hemoglobina, hematocrito,

volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, volumen plaquetario medio y ferritina (Sharma y col., 2016), además puede producir un aumento en el conteo de leucocitos debido a la disminución de la actividad hematopoyética ideal. Lo anterior es consecuencia de la interferencia de aluminio en las diferentes etapas de los eritrocitos desde su síntesis hasta su etapa madura. (Manisha y col., 2013).

Hemoglobina. El citoesqueleto también es muy importante para mantener los componentes celulares en particular, la hemoglobina que es la proteína principal en los eritrocitos y es responsable del transporte de oxígeno y dióxido de carbono hacia y desde los tejidos. Por lo tanto, el nivel de hemoglobina intracelular podría usarse para determinar la viscosidad citoplásmica (Farag y Alagawany, 2018).

Ferritina. El aluminio y ferritina poseen características físico-químicas similares (Kisnieriené y Lapeikaité, 2015), gracias a las cuales existen ocasiones donde el aluminio ocupa el espacio del hierro en el almacenamiento en ferritina. Su liberación es posible por medio de dos fases: la primera caracterizada por una sobrecarga de aluminio-ferritina y la posterior fase es por la liberación de aluminio de ferritina causada por una posible pérdida de la capacidad funcional de la molécula de ferritina (De Sole y col., 2013).

Capacidad total de fijación de hierro. En la capacidad total de fijación de hierro, se determina la cantidad total de hierro en sangre y mide la capacidad de unión de transferrina con el Fe. El aluminio provoca un aumento de capacidad total de fijación de hierro lo cual significa tiene la capacidad de modular la deficiencia de hierro mediante un mecanismo compensatorio que implica aumentar los niveles de transferrina y con ello la capacidad total de fijación de hierro (Zhang y col., 2011).

Leucocitos. Un estudio realizado por Skarabhatava y col. (2015) demuestra que, así como en los eritrocitos, en los leucocitos la exposición a altas

concentraciones de aluminio en células humanas interfiere aumentando la fluidez de la membrana, y disminuyendo el orden lipídico de la parte externa de la membrana celular. Estudios afirman que debido a la exposición a aluminio se presenta un aumento de leucocitos (Sharma y col., 2010; Manisha y col., 2013) en especial de neutrófilos y monocitos, esto debido a la activación del sistema inmune en respuesta a un agente externo como lo es en este caso el metal (Sharma y col., 2016).

Plaquetas. Por peroxidación lipídica, aluminio es capaz de producir agregación plaquetaria, implicada de forma importante en algunos casos (Gómez, 2001). Esto es más frecuente en pacientes con IRC debido a la acumulación por la disminución de excreción de aluminio (Nelva y col., 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Investigación básica de tipo experimental y con variables controladas por diseño.

Condiciones de Manejo

Animales

Veinticinco ratas adultas hembra de la variedad Sprague Dawley con un peso de 200 g \pm 20 g obtenidas del bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora, fueron utilizadas en la presente investigación (Fig. 4).

Manejo

Los animales se colocaron en jaulas individuales organizadas en un rack movable, ambos de acero inoxidable (Fig. 5), en un ambiente controlado de ciclos de luz/oscuridad de 12 hr cada uno, humedad (50 % \pm 5 %), temperatura controlada (25°C \pm 1°C), agua y alimento (*LabDiet*[®] 5001) *ad libitum* (Kalaiselvi y col., 2014).

Consideraciones Bioéticas

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora con el oficio No. CEI-UNISON 10/2018.

El área total del bioterio, del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora, es de 160 m² y contiene 5 salas de 4 x 2.5 m (10 m²) cada una las cuales son exclusivas para el manejo animal. Además, se utilizaron jaulas de acuerdo con las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 1999).



Figura 4. Rata hembra de la variedad Sprague Dawley.



Figura 5. Rack movable para ratas Sprague Dawley.

La persona encargada del bioterio tiene una experiencia de 28 años en el manejo de rutina de animales experimentales. Cuenta con participaciones en una gran cantidad de proyectos de investigación, los cuales incluyen el mantenimiento, manejo, sacrificio y disposición final de los modelos animales, por lo que se garantiza no existió sufrimiento innecesario de las ratas.

En este sentido, se cumplió con las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 1999) y NOM-033-ZOO-2014 (SAGARPA, 2014) y así como con el cumplimiento de los formularios de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency, EMEA).

Diseño Experimental

Tratamientos

Veinticinco ratas adultas hembra de la variedad Sprague Dawley aleatorizadas en cinco tratamientos experimentales de cinco ratas cada uno, alimentadas y tratadas bajo el siguiente esquema:

Grupo A: Dieta basal y administración de solución salina fisiológica al 0.98 % (Control negativo).

Grupo B: Dieta basal y administración de 10 mg de Al/Kg de peso corporal de la rata.

Grupo C: Dieta basal y administración de 20 mg de Al/Kg de peso corporal de la rata.

Grupo D: Dieta basal y administración de 30 mg de Al/Kg de peso corporal de la rata.

Grupo E: Dieta basal y administración de 40 mg de Al/Kg de peso corporal de la rata.

Preparación de Soluciones

Todo el material utilizado en la preparación de las soluciones fue lavado con detergente líquido comercial para retirar suciedad y posteriormente fue sometido a una solución de HNO_3 al 20 % (grado analítico 70% marca Fermont) durante 12 horas. Transcurrido el tiempo, fue enjuagado perfectamente y a conciencia con agua desionizada para retirar todo residuo de ácido y evitar la contaminación por elementos traza y finalmente fue secado para su posterior empleo (Yahaya y col., 2013).

Reactivos utilizados. Cloruro de sodio (NaCl) 99.78 % de pureza de J.T.Baker (Xalostoc, Edo de México, México) y Cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 99.0 % pureza de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA).

Solución salina fisiológica 0.9 %. Se pesaron 4.5 g de NaCl los cuales se adicionaron a 500.0 mL de agua desionizada.

Soluciones de AlCl_3 . Para la preparación de las soluciones de 10, 20, 30 y 40 mg de Al/Kg de peso corporal de la rata, se pesaron 9.04, 18.0, 27.1, 36.1 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ respectivamente, los cuales se colocaron en recipientes previamente lavados, secados, etiquetados y adicionados con 500.0 mL de agua desionizada.

En todo momento se tomó en cuenta la concentración de las moléculas de agua ($6\text{H}_2\text{O}$) para cada una de las soluciones, para así asegurar la correcta administración de AlCl_3 .

Administración de AlCl_3 por Vía Intragástrica

Las ratas fueron tratadas con dosis de 10, 20, 30 y 40 mg de Al/Kg de peso corporal aplicado por vía intragástrica acorde al método de Huggins cinco días a la semana durante 90 días (Fig. 6).



Figura 6. Administración de AlCl_3 vía intragástrica.

Las ratas del grupo control fueron tratadas con solución salina fisiológica 0.9 % por vía intragástrica, para igualar las condiciones de manejo animal (Bobrowska-Korczak y col., 2012; Oztürk y Ozdemir, 2015).

Obtención de Muestras Biológicas

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de sangre periférica mediante punción intracardiaca (Fig. 7) de ratas previamente anestesiadas en cámara de halotano (CHCl_3) de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA). La sangre se extrajo mediante el uso de jeringas de 5 mL BD Plastipak™ con aguja de 21Gx32mm. Inmediatamente la sangre se colocó en tubos BD Vacutainer® con EDTA K_2 y en tubos BD Vacutainer® para suero con activador de coagulación, siendo estos últimos centrifugados a 800 g durante 10 min para la obtención de suero.

Una vez obtenido el suero, fue separado en alícuotas para la determinación de hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro y ferritina. En el caso de la sangre colocada en tubos con EDTA K_2 , se utilizó para la realización de extendidos sanguíneos, la determinación de la concentración de aluminio, perfil cinético de hierro y citometría hemática.

Posteriormente, se le practicó eutanasia a cada rata de acuerdo con lo establecido en la NOM-033-ZOO-2014 (SAGARPA, 2014), para así evitar el sufrimiento animal, dando a su vez cumplimiento de los formularios de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency, EMEA).



Figura 7. Extracción de sangre periférica por punción intracardiaca.

Ensayos

Determinación de la Concentración de Aluminio

El material de laboratorio utilizado en la determinación de aluminio fue sometido a un control sanitario siguiendo el método recomendado por la Norma Mexicana NMX-AA-115-SCFI-2015 (Secretaría de Economía, 2015).

Los materiales de trabajo de vidrio (pipetas serológicas, pipetas volumétricas y matraces volumétricos Pyrex) fueron lavadas con soluciones de detergente líquido comercial para retirar toda suciedad y posteriormente fueron sometidos a una solución de ácido nítrico (HNO_3) al 20 % (grado analítico 70% marca Fermont) durante 36 horas. Transcurrido el tiempo, fueron enjuagados con agua desionizada para evitar la contaminación por elementos traza. Finalmente, el material fue secado y almacenado en recipientes de plástico limpios con tapa hermética hasta su uso.

Digestión de muestras. Una característica de la técnica de absorción atómica, el cual es el método por utilizar, es que el analito se encuentre en solución para poder efectuar su cuantificación. Por lo anterior, se debe hacer una digestión previa de la muestra para eliminar los componentes orgánicos que puedan interferir en el análisis cuidando que los reactivos utilizados no generen interferencia con el método.

Se utilizó sangre periférica proveniente de cada rata previamente colocada en tubos BD Vacutainer® con EDTA K_2 y el material de referencia certificado (MRC) NIST 1566b para ser digeridos en el horno de microondas MARSXpress CEM (Fig 8).

Se utilizó el método de digestión de sangre, el cual se encuentra estandarizado en el Laboratorio de Contaminantes Metálicos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora.

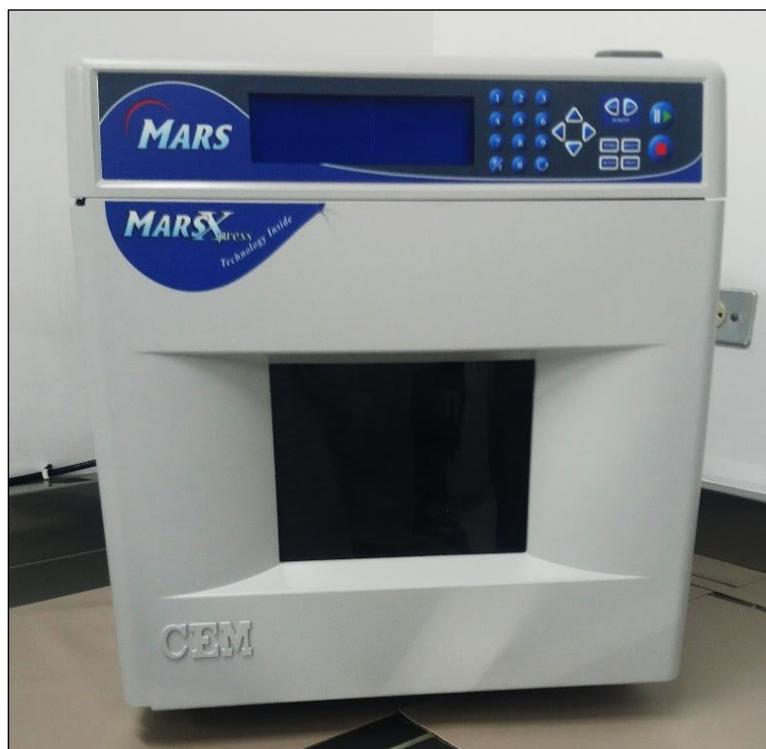


Figura 8. Horno de microondas MARSXpress CEM para digestión de muestras sanguíneas.

Se pesaron 0.4 ± 0.02 g de cada muestra sanguínea por única ocasión y 0.4 ± 0.02 g del material de referencia certificado por triplicado, colocándolos en tubos de digestión de teflón de 15 cm x 2.5 cm. Se agregaron 5 mL de HNO₃ concentrado (Suprapur Merck) y 2 mL de H₂O₂ al 30 % (con pureza del 29 % al 32 %, marca Fermont) homogenizando suavemente y dejando reposar durante 30 minutos para una pre-digestión.

Posteriormente se adicionaron 5 mL de agua desionizada para colocar cada tubo de digestión en el Horno de Microondas MARSXpress CEM bajo las siguientes condiciones: Rampa hasta 200 °C durante 20 minutos, mantenimiento a 200 °C durante 15 minutos, 30 minutos de enfriamiento todo esto a 35 barr de presión, 1600 watts de potencia. El extracto ácido resultante se aforó a 50 mL con agua desionizada para posteriormente cuantificar la concentración de aluminio (Bohrer y col., 2008; CEM Corporation, 2009).

Cuantificación de la concentración de aluminio. La determinación de la concentración de aluminio en estándar, material de referencia certificado y sangre completa de las ratas, se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica modalidad horno de grafito (EAAHG) ya que es un método bien establecido, además de ser una excelente técnica con gran sensibilidad teniendo un límite de detección en el rango de partes por billón (ppb) o su equivalente de µg/L, debido a que se pueden utilizar volúmenes de muestra muy bajos.

Se utilizó el equipo automatizado AANALYST 400 PERKIN-ELMER (Fig. 9) ubicado en el Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora en Hermosillo, Sonora bajo las condiciones de operación recomendadas por el fabricante (Neiva et al. 2002; Perkin Elmer, 2012).



Figura 9. Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo AAnalyst 400, con horno de grafito H6-900 (Perkin Elmer, 2012).

Con la finalidad de verificar y validar los resultados obtenidos, se determinaron los siguientes parámetros analíticos de calidad: Linealidad y exactitud (CENAM-EMA, 2008).

Linealidad. Parámetro que se determina a través del coeficiente de correlación de Pearson (R). Se realizó una curva de calibración a partir de un estándar de aluminio de 1000 mg/L (AccuTrace reference standard). Las concentraciones de trabajo fueron de 20, 100, 200, 300 y 400 µg/L de aluminio. Para preparar las disoluciones de trabajo se preparó una disolución de 0.4 ppm tomando 10 mL del estándar de aluminio de 1000 mg/L y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 2 mL de HNO₃ concentrado y 10 mL de cloruro de potasio (KCl) al 2 %, posteriormente se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Se determinó la concentración de aluminio en el equipo de EAAHG y se le dio la instrucción al equipo de realizar la curva de calibración para las concentraciones restantes graficando concentración contra absorbancia y se estimó el valor de R. El criterio de aceptación es de $R \geq 0.995$ (Miller y Miller, 2002).

Exactitud. Se estimó mediante el porcentaje de recuperación (% Rec). Se calculó en base a los resultados obtenidos a través de las determinaciones del material de referencia certificado (NIST 1566b, Gaithersburg, Maryland, US) que contenía 197.2 ± 6.0 mg/Kg de aluminio. El % Rec se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\% Rec = \frac{\text{valor medido}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

Acorde a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el criterio de aceptación es $\% Rec = 100 \pm 5$ (rango: 95-105) (Thompson y col., 2002).

Determinación del Perfil Cinético de Hierro

La determinación de hierro sérico, capacidad de fijación de hierro (TIBC), saturación de transferrina (% ST), ferritina, citometría hemática y análisis diferencial de frotis sanguíneo fueron realizadas en Laboratorios Acuña y Asociados, S.C. en Hermosillo, Sonora.

Determinación de hierro sérico. Se utilizó sangre periférica proveniente de cada rata previamente colocada en tubos BD Vacutainer® para suero con activador de coagulación y se centrifugaron a 800 g durante 10 min para la obtención de suero. Una vez obtenido el suero, fue separado en alícuotas para la determinación de hierro sérico en el equipo VITROS® DT 60 II (Fig. 10) (Ortho-Clinical Diagnostics, 2004).

El método utilizado es el de láminas VITROS® hierro el cual es un elemento analítico colorimétrico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. En la lámina se depositan 10 µL de muestra de suero que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. El hierro (en forma de ión férrico) (Fe^{3+}) se desprende de la transferrina en pH ácido y migra hacia la capa reductora, donde el ácido ascórbico reduce el hierro a la forma ferrosa (Fe^{2+}). El ión ferroso se une al colorante y forma un complejo coloreado en la capa reactiva. Tras la adición de la muestra, la lámina se incuba y la densidad de la reflectancia se mide a 630 nm después de 1 y 5 minutos. La diferencia de la densidad de reflexión es proporcional a la concentración de hierro en la muestra (Ortho-Clinical Diagnostics, 2003).

Determinación de la capacidad total de fijación de hierro. A partir de suero sanguíneo separado en alícuotas de 125 µL para su determinación en el Fotómetro de química clínica SEAC de QC Diagnostics (QC Diagnostics, 1999) (Fig. 11).



Figura 10. VITROS® DT 60 II para hierro sérico (Ortho-Clinical Diagnostics, 2004).



Figura 11. Fotómetro de química clínica QC Diagnostics, para la determinación de la capacidad total de fijación de hierro (SEAC, 1999).

Se utilizaron los kits: capacidad total de fijación de hierro de BioSystems y el kit hierro-cromazurol de BioSystems. En esta técnica la transferrina sérica se satura añadiendo a la muestra un exceso de iones Fe^{3+} . El Fe^{3+} no unido se precipita con magnesio hidroxicarbonato (presente en el kit para capacidad total de fijación de hierro), y el hierro unido a proteína en el sobrenadante se mide espectrofotométricamente a 625 nm por medio del reactivo para hierro-cromazurol de BioSystems en el cual el Fe^{3+} presente en la muestra forma un complejo coloreado con el cromazurol B y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio. La preparación de reactivos y procedimiento para la determinación se realiza acorde a los insertos de los reactivos (BioSystems, 2013; BioSystems, 2016).

Determinación de saturación de transferrina. Para calcular el % ST primero se determinó la capacidad total de fijación de hierro y los niveles de hierro sérico, por consiguiente, se calculó el % ST según la siguiente ecuación (Sermini y col., 2017).

$$\% ST = \frac{\text{Hierro sérico}}{TIBC} \times 100$$

Determinación de ferritina. Se utilizó sangre periférica proveniente de cada rata previamente colocada en tubos BD Vacutainer® para suero con activador de coagulación centrifugándose a 800 g durante 10 min para la obtención de suero. Una vez obtenido el suero se separó en alícuotas de 10 μL de muestra para una posterior dilución 1:40 con agua destilada para la determinación de ferritina por método de ELISA® en un espectrofotómetro Eli Read RT-2100C (KONTROLab®, 2002), analizador de microelisa utilizando el kit de ferritina de rata ab157732 de la marca abcam® (Fig. 12).



Figura 12. Espectrofotómetro Eli Read RT-2100C para determinación de ferritina por ELISA (KONTROLab ®, 2002).

En este ensayo, la ferritina presente en las muestras reacciona con los anticuerpos antiFerritina que se han adsorbido a la superficie de los pocillos de microtitulación de poliestireno. Después de la eliminación de las proteínas no unidas mediante el lavado, se agregan anticuerpos antiferritina conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Estos anticuerpos marcados con enzimas forman complejos con la ferritina previamente unida. Tras otra etapa de lavado, la cantidad de enzima unida en el complejo se mide mediante la adición de un sustrato cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

La cantidad de enzima unida varía de forma proporcional con la concentración de ferritina en la muestra analizada; por lo tanto, la absorbancia, a 450 nm, es una medida de la concentración de ferritina en la muestra de prueba. La cantidad de ferritina en la muestra de prueba se puede interpolar a partir de la curva estándar construida a partir de los estándares (abcam, 2016).

El procedimiento de verificación y validación de la cuantificación de ferritina exige por procedimiento de fabricante realizar una curva de calibración con los estándares proporcionados. Las concentraciones utilizadas fueron 12.5, 25, 50, 100, 200, ng/mL de ferritina de rata.

El kit de ferritina de rata ab157732 proporciona una curva teórica en base la cual se procede a obtener el coeficiente de correlación (R) de ambas y calcular grado de asociación entre las curvas en base a la siguiente ecuación (abcam, 2016):

$$\text{Grado de asociación} = \frac{R_{\text{experimental}}}{R_{\text{teórico}}} \times 100$$

Citometría Hemática

El recuento de eritrocitos, cuantificación de hemoglobina, hematocrito, amplitud de distribución eritrocitaria (RDW), cuenta de leucocitos, plaquetas y volumen plaquetario medio (VPM) se realizó a partir de muestras en tubos BD Vacutainer® con EDTA K₂ y determinadas de manera automatizada en el analizador hematológico Cell Dyn 1700 de la marca Abbott Diagnostics (Abbott Diagnostics, 1995) (Fig. 13).

Análisis Diferencial de Frotis Sanguíneo

El examen de frotis de sangre periférica para el diagnóstico diferencial de las células se asocia con la característica de tinción y el conocimiento correcto de la morfología de las diferentes células sanguíneas. El estudio del frotis de sangre teñida se considera uno de los métodos más importantes en el análisis hematológico (Akhlaghi y Ahmadi-Hamedani, 2019).

Se utilizaron portaobjetos nuevos previamente limpiados con etanol 70°, realizándose dos frotis sanguíneos de sangre periférica adicionada con EDTA por muestra. Las láminas fueron secadas al aire y fijadas con metanol absoluto durante 3 min, se retira el exceso de metanol y se deja secar al aire. Posteriormente se adicionaron 18 gotas de colorante Wright-Giemsa durante 1 minuto. Sin retirar colorante, se añaden 9 gotas de la solución amortiguadora y se deja actuar por 4 min. Finalizado el tiempo, se procede a lavar con agua destilada durante 15 segundos y se seca al aire dejando la preparación colocada verticalmente sobre un papel absorbente.

Se analizaron al microscopio óptico con 40 y 100 aumentos. Durante el análisis se evalúa observación y diferenciación de leucocitos, así como morfología de eritrocitos y plaquetas.



Figura 13. Analizador hematológico Cell Dyn 1700 de Abbott Diagnostics para la realización de citometría hemática (Abbott Diagnostics, 1995).

Pruebas Citoquímicas

Las reacciones citoquímicas son útiles para reconocer enzimas, hidratos de carbono, lípidos u otras sustancias en las diferentes líneas hematopoyéticas; particularmente su valor práctico reside en identificar el linaje celular comprometido en las leucemias agudas, y en el diagnóstico diferencial de síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos (Tentoni y col., 2007).

Cada prueba citoquímica fue realizada a partir de un extendido de sangre periférica con EDTA de una muestra por grupo de tratamiento elegida completamente al azar obteniendo así cinco extendidos por cada tinción, secadas al aire y fijadas con metanol absoluto durante 5 minutos.

Fosfatasa alcalina. Se utiliza para la delimitación citoquímica de una leucemia mieloide crónica (LMC) y de otras enfermedades del tipo mieloproliferativas, especialmente mielofibrosis y policitemia u otros procesos inflamatorios o tumorales es adecuada la determinación de la actividad (índice) de la fosfatasa alcalina leucocitaria. Además, el índice de la fosfatasa alcalina leucocitaria representa un parámetro sencillo para el caso de LMC, reflejando diversas fases de actividad de la enfermedad. La fosfatasa alcalina leucocitaria cataliza la hidrólisis de ésteres fosfóricos en medio alcalino. El 1-naftol liberado a partir del fosfato de 1-naftilo se acopla con una sal de diazonio para dar un color pardo, que precipita en la célula de acuerdo con la localización y la actividad de la fosfatasa alcalina en la célula (Merck Millipore, 2017a).

Posterior a la fijación del extendido se realizó la tinción por medio del kit LEUCOGNOST®-ALPA - Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en GB de Merck Millipore, preparándose en base a las especificaciones señaladas por el kit. En consiguiente se realizó una contra tinción Wright (marca Merck Millipore) durante 12 minutos y se enjuagó con agua destilada por 30 segundos.

La actividad de la fosfatasa alcalina se manifiesta en forma de un precipitado pardo negruzco en el citoplasma. La evaluación de la reacción se llevó a cabo evaluando 100 neutrófilos segmentados; en caso de una neutropenia como máximo hasta un 10 % de granulocitos con núcleo en banda. Se toma en cuenta el grado de intensidad de la tinción distinguiéndose cinco grados de intensidad de color.

Grado de intensidad 0: sin reacción.

Grado de intensidad 1: de uno a pocos gránulos.

Grado de intensidad 2: muchos gránulos localizados.

Grado de intensidad 3: gránulos difusamente distribuidos.

Grado de intensidad 4: célula completamente ocupada de gránulos.

Grado de intensidad 5: número máximo de gránulos, frecuentemente no se puede ver el núcleo.

Una vez finalizada la observación, se procede a determinar cuánto porcentaje se obtuvo de cada grado para posteriormente ese porcentaje se multiplique por su grado correspondiente. Ejemplo: 8 % de células grado de intensidad cero da como resultado cero; 42 % de células grado de intensidad uno da como resultado en 42; 24 % de células grado dos da como resultado 48; y así sucesivamente, hasta finalizar con el quinto grado. Una vez obtenido todos los valores, se suman y el resultado final es el índice de fosfatasa alcalina (índice ALPA). Posteriormente se determina si se encuentran dentro de los rangos de referencia. Rangos de referencia 10 - 100.

Un índice disminuido es patognomónico para la fase activa en una LMC Como máximo en las anemias hemolíticas, las anemias por deficiencia de hierro o algunas enfermedades víricas se pueden observar valores de índices comparablemente bajos. Los valores normales y elevados tienen siempre un

significado múltiple, de manera que carecen de importancia para un diagnóstico diferencial. También la LMC en remisión puede mostrar valores normales o incluso aumentados de ALPA. En general, el índice será más alto en cuanto más pronunciados sean los procesos de disgregación necrobióticos que tengan lugar en el marco de procesos inflamables o tumorales (Merck Millipore, 2017a).

Peroxidasa. La reacción de peroxidasa sirve de indicador para la presencia de elementos celulares mieloides. El grado de madurez de los granulocitos en maduración puede ser estimado esencialmente según la intensidad de la reacción cromática pardo-negrucza. Las peroxidasas son catalasas lisosomales que transfieren el hidrógeno desde un donador adecuado (anteriormente la bencidina cancerígena 4-cloro-1-naftol) a un peróxido (peróxido de hidrógeno). Entonces el donador 4-cloro-1-naftol se oxida y se transforma en un colorante insoluble pardo negruzco, que puede utilizarse como indicador de la correspondiente actividad de peroxidasas.

Una vez fijados los extendidos se realizó la tinción utilizando el kit de LEUCOGNOST® POX para la detección de la reacción de la peroxidasa en leucocitos Merck Millipore el cual se preparó y utilizó en base a las condiciones indicadas por el kit. Se realizó una contra tinción Wright (marca Merck Millipore) durante 10 minutos y se lavó con agua destilada por 30 segundos.

Como consecuencia de la reacción de peroxidasa (POX), todas las células de la serie de maduración neutrófila y especialmente de la eosinófila a partir de los promielocitos son claramente peroxidasa-positivas si se ven gránulos con tinción pardo-negrucza. Los mieloblastos más maduros también pueden presentar algunos islotes de fermento peroxidasa-positivos en su citoplasma. La mayoría de los monocitos normales igualmente reacciona de forma peroxidasa-positiva; sin embargo, la intensidad de la tinción es claramente inferior en comparación con los granulocitos neutrófilos y eosinófilos. Los granulocitos

basófilos, así como todas las células de las series linfática y eritropoyética son peroxidasa-negativas (Merck Millipore, 2017b)

En el caso de leucemia peroxidasa positiva se distinguen tres tipos de reacción (Merck Millipore, 2017b):

POX 1: hasta 5 % de blastos POX positivos. LMA sin tendencia a madurez; no se excluyen a leucemia indiferenciada aguda (LIA) o leucemia linfocítica aguda (LLA)

POX 2: de 5 % hasta 65 % de blastos POX positivos. Leucemia mieloide aguda (LMA) con tendencia a madurez o leucemia mielomonocítica aguda (LMMA).

POX 3: más de 65% de blastos POX positivos. LMA con tendencia a madurez hasta llegar a leucemia promielocítica aguda (LPA).

α -naftil acetato esterasa. Las reacciones de esterases con diversos sustratos facilitan la diferenciación entre leucemias mieloblásticas y monoblásticas. Aparte de la reacción de naftol AS-D-cloroacetato-esterasas, cuyo poder declarativo es comparable al de la reacción de las peroxidases, la reacción de 1-naftilo-acetato-esterasas es adecuada sobre todo para la delimitación de leucemias monoblásticas. Estas enzimas aceleran la disgregación hidrolítica del acetato de 1-naftilo en ácido acético y 1-naftol, que se acopla con una sal de diazonio dando un azocolorante pardo rojizo insoluble en agua.

Con el extendido fijado y secado al aire se tiñó utilizando el kit de LEUCOGNOST®EST para la identificación de la reacción de α -naftil acetato esterasa en leucocitos acorde a las indicaciones dadas por el kit. Terminada la tinción, se realizó una contra tinción con colorante Wright (Merck Millipore) para mejor visualización. La 1-naftil acetato-esterasa (EST) muestra en todas las células de la hematopoyesis una reacción débil. Reaccionan de forma

intensificada especialmente monocitos, células plasmáticas, eritroblastos y megacariocitos. La reacción es de color pardo rojiza, granulosa.

Para la clasificación de leucemias agudas se determina el porcentaje de blastos esterasa positivos y se realiza la siguiente clasificación teniendo en cuenta reacciones simultáneas de peroxidasas de diferente graduación:

Tipo peroxidasas: menos del 25 % de EST positivos. LMA o LPA.

Tipo mixto POX-ETS: 25 % - 50 % blastos EST positivos. LMMA.

Tipo esterasas: más de 50 % de blastos EST positivos. Leucemia monocítica aguda (LMoA). (Merck Millipore, 2017c).

Análisis Estadístico

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, la cual es una prueba de normalidad para muestras menores a 50 (Ghasemi y Zahediasl, 2012), con la finalidad de analizar si la distribución de los resultados concuerda con la campana de gauss (Argote–Cusi, 2009). Debido a que los datos obtenidos en la presente investigación no presentaron una normalidad, se utilizó un análisis estadístico no paramétrico utilizando la prueba de Kruskal-Wallis (Guo y col., 2013). Las diferencias se consideran significativas a un nivel de $p < 0.05$. Todos los análisis se efectuaron con el paquete estadístico IBM SPSS statistics versión 22.0.

La prueba propuesta por Kruskal y Wallis evalúa si dos o más muestras son de una misma distribución (Guo y col., 2013) Esta prueba se basa en un análisis de medias (Elliott y Hynan, 2011). La hipótesis nula para Kruskal Wallis es que los datos provienen de poblaciones de una misma procedencia, es decir, de una misma distribución (Guo y col., 2013). Cuando se rechaza la hipótesis nula para la prueba ($p < 0.05$), es evidencia de que al menos dos grupos son diferentes (Elliott y Hynan, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sujetos de Estudio

El presente estudio se inició con cinco grupos de cinco ratas cada uno, para un total de veinticinco ratas. En el transcurso del estudio se tuvieron pérdidas de cuatro sujetos, por lo tanto, se culminó con veintiún ratas. A continuación, se presenta un desglose de la población final.

Grupo A: cinco ratas.

Grupo B: tres ratas.

Grupo C: cuatro ratas.

Grupo D: cuatro ratas.

Grupo E: cinco ratas.

En cada deceso se buscaban las posibles causas del fallecimiento, sin embargo, hasta el momento no se tiene un motivo claro. No se encontró aparente relación entre los decesos y el manejo o administración de AlCl_3 en los animales.

Ensayos

Determinación de la Concentración de Aluminio

Linealidad. Se realizó una curva de calibración a partir de un estándar de aluminio (Al) de 1000 mg/L (AccuTrace reference standard). Las concentraciones de trabajo fueron de 20, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/L}$ de aluminio con la cual se evalúa la linealidad en base al coeficiente de correlación (R) y al coeficiente de regresión lineal (R^2) (Fig. 14). El coeficiente de correlación indica el grado de correlación lineal que existe entre dos variables (absorbancia contra concentración) que varían conjuntamente, es decir, la tendencia que tiene la recta a dispersarse.

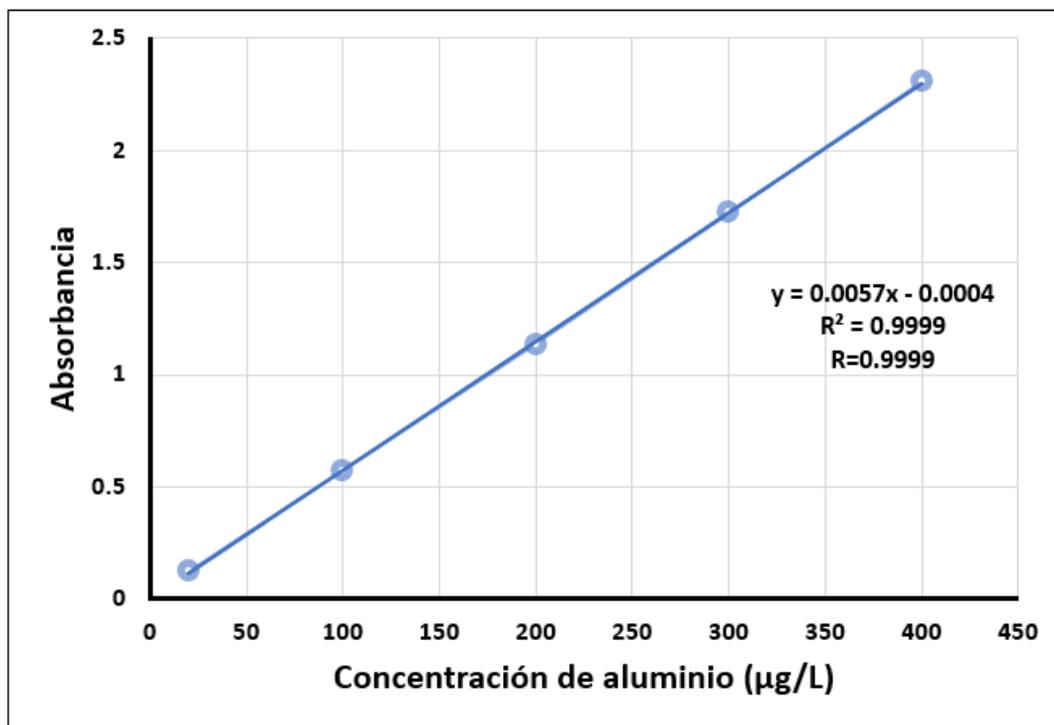


Figura 14. Curva de calibración para aluminio a partir de un estándar de aluminio de alta pureza por medio de EAAHG.

En el caso de R^2 , indica si se obtuvo una la relación entre una variable explicativa y una variable respuesta, es decir, si el modelo de regresión utilizado es el ideal (Lavallo y col., 2006). Se obtuvieron los siguientes valores: $R = 0.9999$ y $R^2 = 0.9999$, siendo ambos aceptables e ideales ya que R y $R^2 \geq 0.995$ (Miller y Miller, 2002) (Fig. 14).

Exactitud. En el porcentaje de recuperación (% de Rec) con el cual se evaluó la exactitud del método siendo determinado a partir de un material de referencia certificado (MRC) del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), se obtuvo como resultado un % de Rec = 98.28 el cual cumple con el rango considerado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) donde el criterio de aceptación es % Rec = 100 ± 5 (rango: 95-105) (Thompson y col., 2002). Esto indica que el método de descomposición utilizado en las muestras de rata Sprague Dawley, y la técnica para cuantificar aluminio, fueron adecuados.

Este resultado es similar al obtenido por García-Alegría y col. (2017), donde se analizaron muestras de tejido mamario, hígado, y hueso de rata Sprague Dawley expuestas a aluminio, y los % de Rec fueron de 100.90, 103.50 y 100.60 respectivamente.

Cuantificación de la concentración de aluminio. En la Tabla I, se presentan las medias de concentración de aluminio en $\mu\text{g/L}$ por cada grupo de tratamiento. Se puede apreciar que no existe diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos experimentales con respecto a la concentración de aluminio. Es decir, la administración de aluminio no conduce a una acumulación aparente del elemento en sangre completa.

Tabla I. Concentración de aluminio ($\mu\text{g/L}$) para cada uno de los tratamientos experimentales.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Aluminio ($\mu\text{g/L}$)	16.65 \pm 0.62	14.49 \pm 0.2732	14.48 \pm 1.014	16.24 \pm 0.2155	12.38 \pm 0.3966

53

Los valores están expresados como valor medio, \pm desviación estándar.

Las concentraciones de aluminio no presentan diferencia significativa entre grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una $p > 0.05$.

Esto concuerda con El Hage Chahine y col. (2012), donde se afirma que una de las mayores actividades de aluminio en sangre es el ser transportado por medio de la formación de complejos estables con transferrina. Debido a lo anterior, el aluminio tiene la posibilidad de transportarse a diversos órganos tales como cerebro, pulmón, hígado, riñón, senos, entre otros, utilizando la sangre como vía de transporte (Bakir y Darbre, 2015; Li y col., 2016; Mirza y col., 2016).

Determinación del Perfil Cinético de Hierro

Para la determinación de perfil cinético de hierro se realizaron las cuantificaciones de hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro y ferritina de forma individual y en los equipos correspondientes. Así mismo se realizó el cálculo para el % de saturación de transferrina (Tabla II).

Determinación de hierro sérico. No se tiene diferencia significativa entre los grupos con una $p > 0.05$. Esto concuerda con Turgut y col. (2004) donde a un grupo de ratas se le administró sulfato de aluminio ($(Al_2SO_4)_3$) y no obtuvieron cambios significativos entre los grupos. Esto contrasta con Zhang y col. (2011) donde en un estudio de 150 días, obtuvieron una disminución de hierro en plasma entre los días 60 y 120, sin embargo, al día 150 incrementó. Afirman esto es posible debido a una primera afectación de aluminio en hierro y el posterior aumento puede deberse a una hemólisis de los eritrocitos debido a afectaciones en la membrana y por ende produce la liberación de hierro intracelular.

Tabla II. Perfil cinético de hierro: Hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro (TIBC), saturación de transferrina y ferritina.

	Valores de referencia*	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Hierro sérico (µg/dL)	139.2 ± 12.3	174.2 ± 17.8	169.0 ± 26.8	187.7 ± 14.1	185.0 ± 23.3	166.0 ± 54.8
TIBC (µg/dL)	283.7 ± 20.5	308.8 ± 39.9	265.6 ± 59.7	300.0 ± 51.0	302.5 ± 46.3	276.6 ± 56.6
Saturación de transferrina (%)	47.32 ± 7.19	56.41 ± 4.47	63.61 ± 4.49	62.58 ± 2.77	61.15 ± 5.04	60.01 ± 0.96
Ferritina (ng/mL)	82.32 ± 2.7 ^a	67.70 ± 4.90	51.31 ± 8.68	61.25 ± 3.15	59.42 ± 11.0	29.81 ± 6.1 ^a

Los valores están expresados como valor medio, ± desviación estándar. Concentraciones de hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro y saturación de transferrina no presentan diferencia significativa entre grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una $p > 0.05$. ^a Ferritina presenta una diferencia significativa entre grupos con una $p < 0.05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis. *(Serrano y col., 2015).

Determinación de la capacidad total de fijación de hierro. La capacidad total de unión al hierro es una medida funcional del nivel de transferrina en circulación (Auerbach y Adamson, 2016). En el presente proyecto, no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos con una $p > 0.05$. Esto concuerda con lo determinado por Farina y col. (2005), quienes no obtuvieron cambios significativos en la capacidad total de unión al hierro ante exposición a aluminio. Esto es debido a la capacidad que posee aluminio para ocupar el espacio del hierro en transferrina (Zhu y col., 2012). El aluminio no compite con el hierro en la unión a la transferrina, sin embargo, dado que solo el 30% de la transferrina se encuentra saturada por hierro férrico, los sitios de transferrina restantes están disponibles para otros metales, como el aluminio (Mujika y col., 2011).

Determinación de saturación de transferrina. Es un índice que toma en cuenta el hierro plasmático y la principal proteína de transporte, la transferrina. La transferrina se considera un marcador bioquímico importante del estado del hierro corporal (Elsayed y col., 2016). En base a los resultados no se tiene diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$), lo cual concuerda con Turgut y col. (2004) donde de igual forma no obtuvieron diferencia en este parámetro. Esto es debido al reemplazo de hierro por parte de aluminio (Skarabahatava y col., 2015) manteniendo, aparentemente, los niveles de transferrina.

Determinación de ferritina. La ferritina es la proteína que refleja las reservas de hierro del cuerpo (Auerbach y Adamson, 2016). Previo a la cuantificación de ferritina se realizó una curva de calibración en base a estándares proporcionados por el kit de ferritina de rata ab157732, donde proporciona una curva teórica la cual funge como base para la realización de la curva experimental (Fig. 15). Una vez realizada la curva experimental se procedió a obtener R de ambas, siendo $R = 0.9873$ para la curva teórica y $R = 0.9792$ para la curva experimental, con lo cual se calculó el grado de asociación entre ambas siendo del 100.00 %.

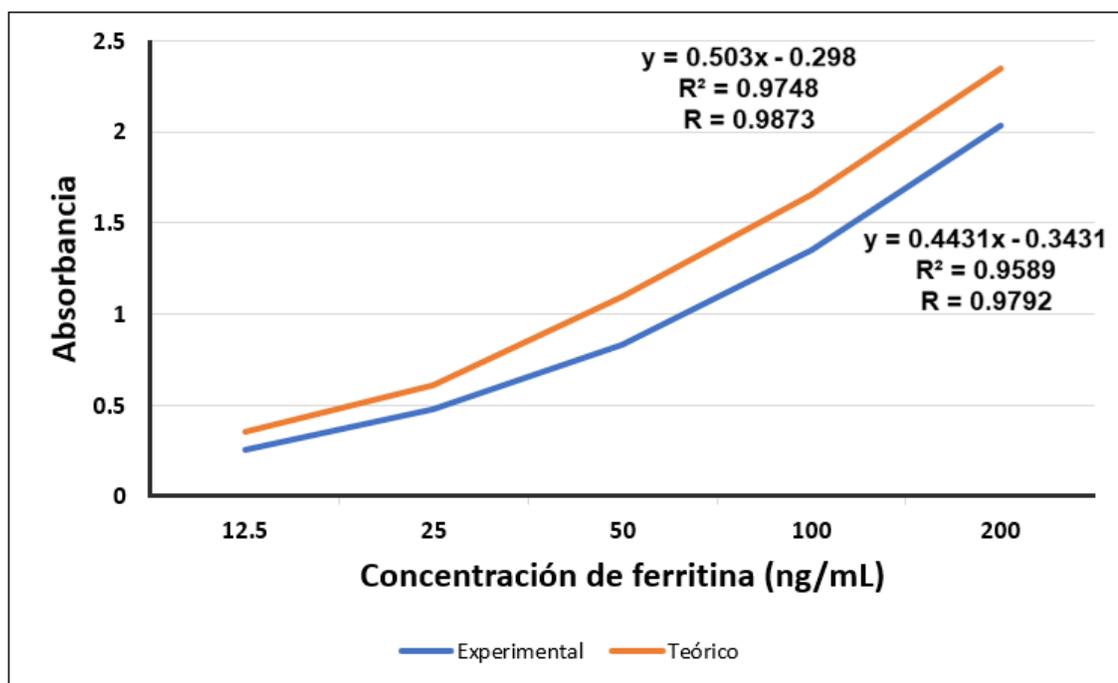


Figura 15. Curva de calibración de ferritina.

En base a los resultados obtenidos en la Tabla II, la concentración de ferritina tiene una diferencia significativa entre grupos con una $p < 0.05$. Conforme aumenta de concentración de aluminio administrado, se observa una disminución en la concentración de ferritina. Esto indica un efecto por parte del aluminio sobre la proteína. Ferritina además de ser la proteína con la función de almacenar hierro, tiene la capacidad de almacenar otros metales, entre ellos aluminio (De Sole y col., 2013). Entre menor concentración de hierro es mayor la absorción y acumulación de aluminio en ferritina, que, al mismo tiempo, la disminución de hierro es una de las consecuencias de la exposición a aluminio (Zhu y col., 2012). Esto indica que ferritina puede funcionar como una proteína reguladora de metales que debido a su concentración pueden ser potencialmente tóxicos (De sole y col., 2013)

La interacción de aluminio con ferritina conlleva dos fases: la primera caracterizada por una sobrecarga de aluminio de ferritina y la posterior fase por la liberación de aluminio en órganos por ferritina causada por una posible pérdida de capacidad funcional de la molécula de ferritina (De sole y col., 2013). Esta pérdida en la funcionalidad de ferritina se estima sea el factor por el cual disminuye la concentración de ferritina en sangre mientras la concentración de aluminio administrado aumenta.

Citometría Hemática

Se analizaron los siguientes parámetros: conteo de eritrocitos, concentración de hemoglobina, concentración de hematocrito, determinación de amplitud de distribución eritrocitaria (RDW), cuenta de leucocitos, conteo de plaquetas y determinación del volumen plaquetario medio (VPM) (Tabla III).

Tabla II. Citometría hemática: eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, amplitud de distribución eritrocitaria (RDW), conteo de leucocitos, plaquetas y volumen plaquetario medio (VPM).

	Valores de referencia*	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Eritrocitos (10⁶cels/μL)	6.39 – 8.01	6.84 ± 0.7	7.11 ± 0.08	6.45 ± 0.97	7.00 ± 0.36	6.57 ± 1.04
Hemoglobina (g/dL)	12.9 – 15.4	14.32 ± 1.3	14.73 ± 0.46	14.70 ± 0.58	14.75 ± 0.57	13.74 ± 1.88
Hematocrito (%)	40 - 46	40.1 ± 3.87	41.93 ± 0.46	41.05 ± 0.75	39.95 ± 1.94	37.38 ± 5.26
RDW (%)	12.23 – 14.5	12.5 ± 0.5	12.10 ± 0.45	12.08 ± 0.26	12.38 ± 0.41	12.82 ± 0.42
Leucocitos (10³cels/μL)	2.58 - 7.34	7.28 ± 3.0	9.20 ± 3.8	8.91 ± 1.5	9.27 ± 2.3	9.32 ± 1.4
Plaquetas (10³cels/μL)	923 - 1580	553.6 ± 62.4	667.3 ± 44.0	736.5 ± 101.7	712.5 ± 43.8	477.2 ± 155.4
VPM (fL)	6.70 – 8.10	5.50 ± 0.5	7.60 ± 0.43	6.88 ± 0.42	6.30 ± 0.24	4.16 ± 0.58

Los valores están expresados como valor medio, ± desviación estándar. Eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, RDW, plaquetas y volumen plaquetario medio no presentan diferencia significativa entre grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una $p > 0.05$. *(He y col., 2017).

No se obtuvo diferencia significativa en ninguna de las determinaciones de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y amplitud de distribución eritrocitaria con una $p > 0.05$ (Tabla III). Esto contrasta con lo ya reportado sobre la interacción de aluminio con los eritrocitos. Aluminio puede alterar la homeostasis del hierro interfiriendo con las proteínas reguladoras del mismo. Debido a que aluminio se une a transferrina dejando fuera al hierro, se da un aumento en la concentración intracelular del hierro lo que causa peroxidación lipídica en los eritrocitos, es decir, un daño a la membrana que conduce a la destrucción de los eritrocitos. Debido a esto, aluminio provoca la disminución en el conteo de eritrocitos, concentración de hemoglobina y hematocrito, lo cual no se observa en el presente estudio (Geyikoglu y col., 2012; Ghorbel y col., 2015). Esto contrasta con lo indicado en otros estudios (Geyikoglu y col., 2012; Manisha y col., 2013; El-Sayed y col., 2016) donde afirman que el aluminio puede interferir con la producción (ya sea aumento o disminución) de células sanguíneas. Así mismo, en un estudio de Sharma y col. (2016) se observa un aumento de leucocitos en ratones expuestos a Al^{3+} y a fluoruro de aluminio (AlF_3), lo cual es debido a la activación del sistema inmune del ratón como respuesta ante un agente extraño en el organismo.

Otro aspecto para considerar es el zinc, el cual es un elemento que se encuentra tanto en eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Aluminio puede interferir con las concentraciones de zinc en huesos (Li y col., 2011). El zinc tiene un papel reconocido en la hemostasia. En una deficiencia como en un aumento excesivo de zinc está asociado con afectaciones plaquetarias. En una activación plaquetaria común, zinc es liberado por las plaquetas aumentando las concentraciones de zinc en el plasma, sin embargo, esta elevación de este metal en plasma, puede aumentar aún más en presencia de aluminio, ya que aluminio puede tomar el espacio correspondiente al zinc, disminuyendo la correcta interacción de zinc con las plaquetas y provocando una activación plaquetaria incorrecta conduciendo a una disminución y agregación de los mismos (Watson

y col., 2016), sin embargo estos son aspectos no observados en el presente estudio.

Análisis Diferencial de Frotis Sanguíneo

El análisis diferencial se llevó a cabo por medio de la observación y conteo de 100 células en láminas de sangre periférica de las ratas expuestas a cloruro de aluminio ($AlCl_3$). Los resultados indican no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos con una $p < 0.05$ (Tabla IV). Lo cual difiere con lo observado por Sharma y col. (2010) donde encontraron que neutrófilos y monocitos se incrementan en tanto linfocitos disminuyen ante aluminio. Así mismo Sharma y col. (2016), expusieron a ratones a Al^{3+} y AlF_3 , donde, comparados con controles, hubo un aumento en el porcentaje de neutrófilos y monocitos en los tratamientos, mientras que el de linfocitos disminuyó. Esto tiene lógica, tomando en cuenta que los neutrófilos son quienes organizan la concentración de monocitos para actuar en contra de un agente extraño, como en este caso lo es el aluminio (HogenEsch, 2013).

El estudio hematológico es una importante herramienta para el diagnóstico de enfermedades y/o alteraciones hematológicas (Sharma y col., 2016). Normalmente los eritrocitos tienen forma y color similares. Las variaciones morfológicas pueden ser de tamaño, forma, coloración, así como modificaciones generales; en cuanto a los leucocitos, en situaciones patológicas pueden observarse cambios semicuantitativos: como leucopenia o leucocitosis, aumento o disminución de alguna de las células que conforman el conteo diferencial, variaciones en la morfología que pueden ser (nucleares, citoplasmáticas y de tamaño) y presencia de células atípicas; en las plaquetas podemos encontrar alteraciones semicuantitativas (trombocitopenia o trombocitosis), morfológicas (anisocitosis plaquetaria, plaquetas fragmentadas, entre otras) y en la forma de agregarse (Terry y Mendoza, 2017)

Tabla III. Análisis diferencial de frotis sanguíneo.

Leucocitos	Valores de referencia*	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Basófilo (%)	0.04 – 0.44	0.20 ± 0.44	0.33 ± 0.57	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
Eosinófilo (%)	0.84 – 4.29	0.60 ± 1.3	0.67 ± 1.15	0.25 ± 0.5	0.00 ± 0.0	0.20 ± 0.44
Neutrófilo (%)	4.27 – 18.48	7.40 ± 2.88	8.33 ± 4.3	12.25 ± 2.7	11.50 ± 4.0	9.20 ± 2.98
Linfocito (%)	71.77 – 89.94	84.20 ± 5.7	83.67 ± 7.3	79.00 ± 2.1	78.25 ± 4.7	84.20 ± 3.2
Monocito (%)	2.10 – 9.34	7.60 ± 4.1	7.00 ± 2.6	8.50 ± 1.0	10.25 ± 4.7	6.40 ± 1.5

Los valores están expresados como valor medio, ± desviación estándar. Porcentaje de basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos no presentan diferencia significativa entre grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una $p > 0.05$. *(He y col., 2017).

En la Fig. 16, se observa un extendido sanguíneo teñido con Wright-Giemsa por grupo elegido al azar para demostración del presente trabajo. En ellos no se presentaron alteraciones tanto en la serie roja, blanca y plaquetaria. Estos resultados difieren con otros estudios, por ejemplo, Sharma y col. (2010; 2016), observaron una alta incidencia de poiquilocitosis en eritrocitos de grupos tratados con aluminio. Así mismo, Bazzoni y col. (2005) observaron una predominancia en la aparición de estomatocitos en ratas tratadas con aluminio. Esto es debido a la expansión de la monocapa interna o bien por contracción de la capa externa. Se atribuye es debido a la alta polaridad de aluminio concentrándose en la interface entre el agua y los lípidos e interactuando con las cabezas de los fosfolípidos disminuyendo la superficie externa de la membrana.

La microcitosis adquirida más representativa es la que se presenta en la deficiencia de hierro, en donde, además de los microcitos e hipocromía característica, puede haber ovalocitos y poiquilocitos. Esta anemia puede ser producida por intoxicación por metales como aluminio (Campuzano, 2008).

Así mismo, alteraciones en la membrana pueden ocurrir no solamente en los eritrocitos, sino también en leucocitos y plaquetas (Neiva y col., 2002; Skarabahatava y col., 2015) debido a la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo que dañan la estructura molecular y la fluidez de la membrana celular (Ugbaja y col., 2017). En las presentes láminas no se observaron alteraciones morfológicas debido a la exposición de aluminio. Únicamente un aspecto observable en los eritrocitos son artefactos, los cuales para fines de este estudio no son relevantes.

Pruebas Citoquímicas

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo muy heterogéneo de enfermedades clonales de las células germinales hematopoyéticas y que por lo tanto pueden alterar cualquiera de las líneas de origen hematopoyético:

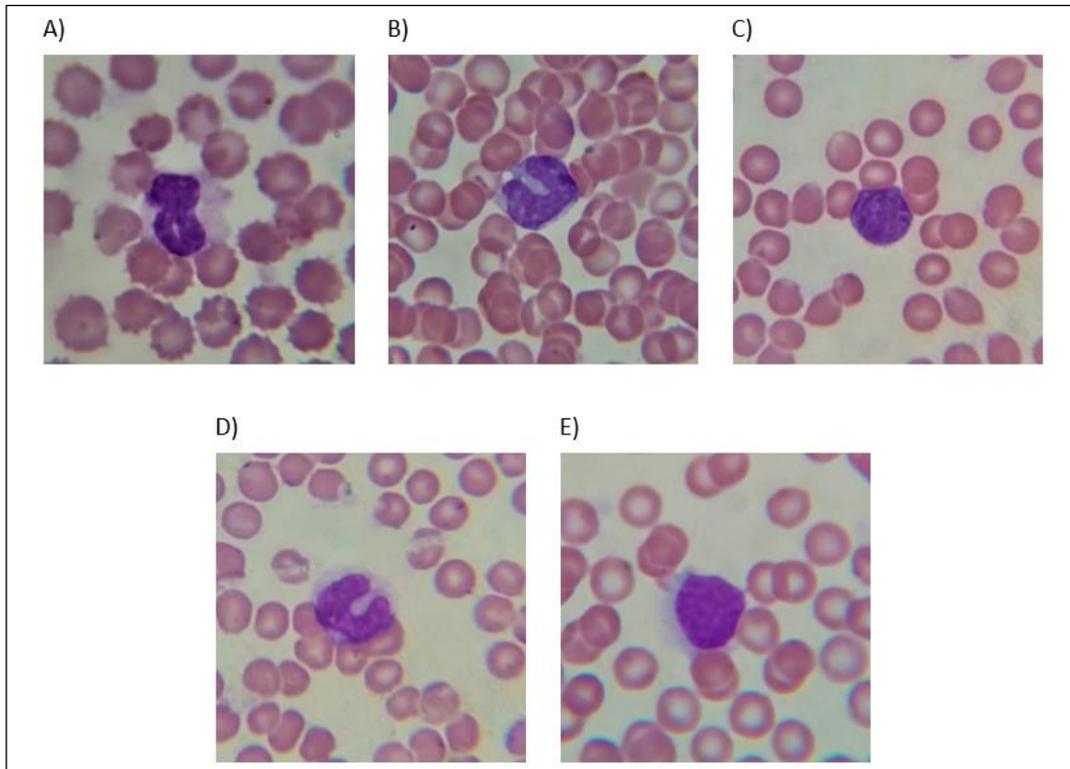


Figura 16. Análisis diferencial de extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de $AlCl_3$ con tinción Wright-Giemsa. A) Grupo A., neutrófilo en banda; B) Grupo B, neutrófilo en banda; C) Grupo C, linfocito; D) Grupo D, neutrófilo; E) Grupo E, monocito.

granulocitos, monocitos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas, células dendríticas y linfocitos. Se sabe puede ser provocado por la exposición a metales pesados como arsénico, plomo y aluminio (León-Bojorge, 2010).

La citoquímica es una manera de identificar uno de los posibles síndromes mieloides. Pueden demostrar una disminución o pérdida de los antígenos de maduración mieloides normal, o la presencia de antígenos que normalmente no se expresan. Las actividades de peroxidasa y fosfatasa alcalina pueden disminuir en las células mieloides, mientras que la esterasa específica de monocitos puede aumentar (Aster y Stone, 2017).

Fosfatasa alcalina. Esta prueba es positiva para la serie granulocítica después de la etapa del mielocito neutrofílico (Ayoubi y col., 2016). En la observación de los extendidos sanguíneos de cada grupo no se detectó presencia de la actividad enzimática por parte de la fosfatasa alcalina en los GB ni alteraciones morfológicas (Fig. 17).

La expresión de la fosfatasa alcalina leucocitaria en neutrófilos se reduce en algunos SMD, pero aumenta en la anemia refractaria (Lipshitz y col., 2006). En base a las laminillas observadas, no se presentó en ellas una actividad de fosfatasa alcalina, sin embargo, su carencia no es sinónimo de ausencia de afectación por parte del aluminio hacia las células. Es necesario profundizar en el estudio de aluminio y su actividad con esta enzima a nivel citoquímico.

Peroxidasa. En la observación de los extendidos sanguíneos no se observa presencia de la actividad enzimática por parte de peroxidasa en los leucocitos ni alteraciones morfológicas (Fig. 18). La peroxidasa es un indicador para la presencia de elementos celulares mieloides. Los neutrófilos y los eosinófilos son peroxidasas fuertemente positivas, mientras que los basófilos son peroxidasas negativas.

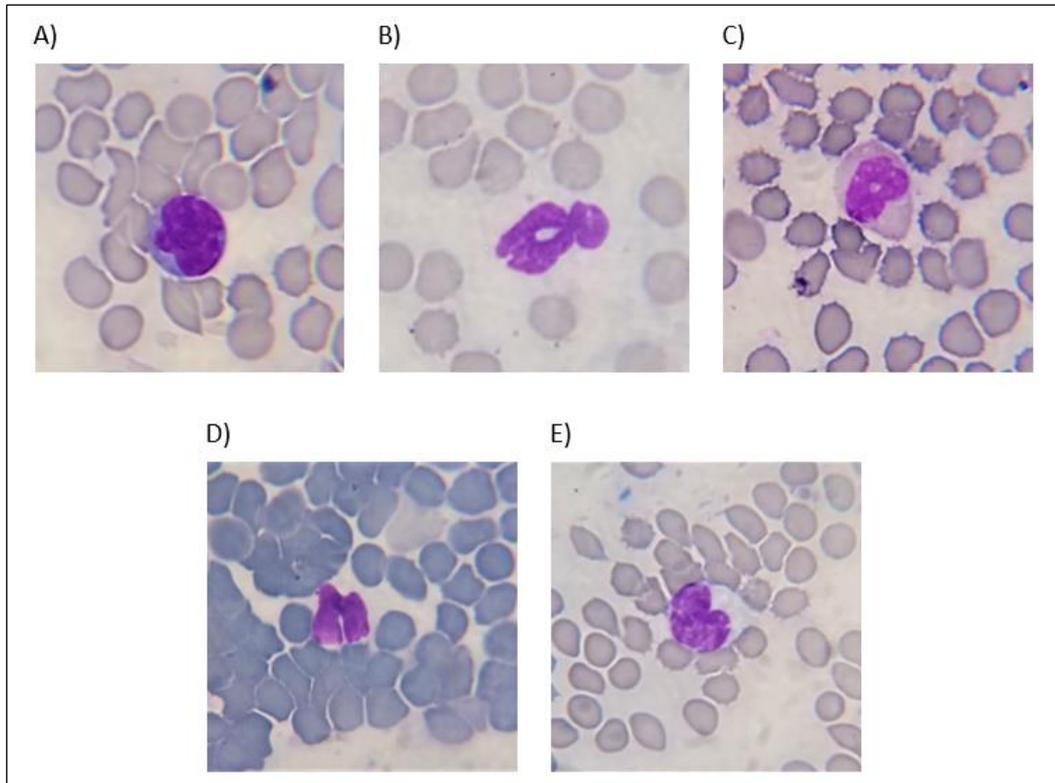


Figura 17. Extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de AlCl_3 con tinción citoquímica fosfatasa alcalina y contra tinción Wright. A) Grupo A., linfocito; B) Grupo B, neutrófilo en banda; C) Grupo C, monocito; D) Grupo D, monocito; E) Grupo E, monocito.

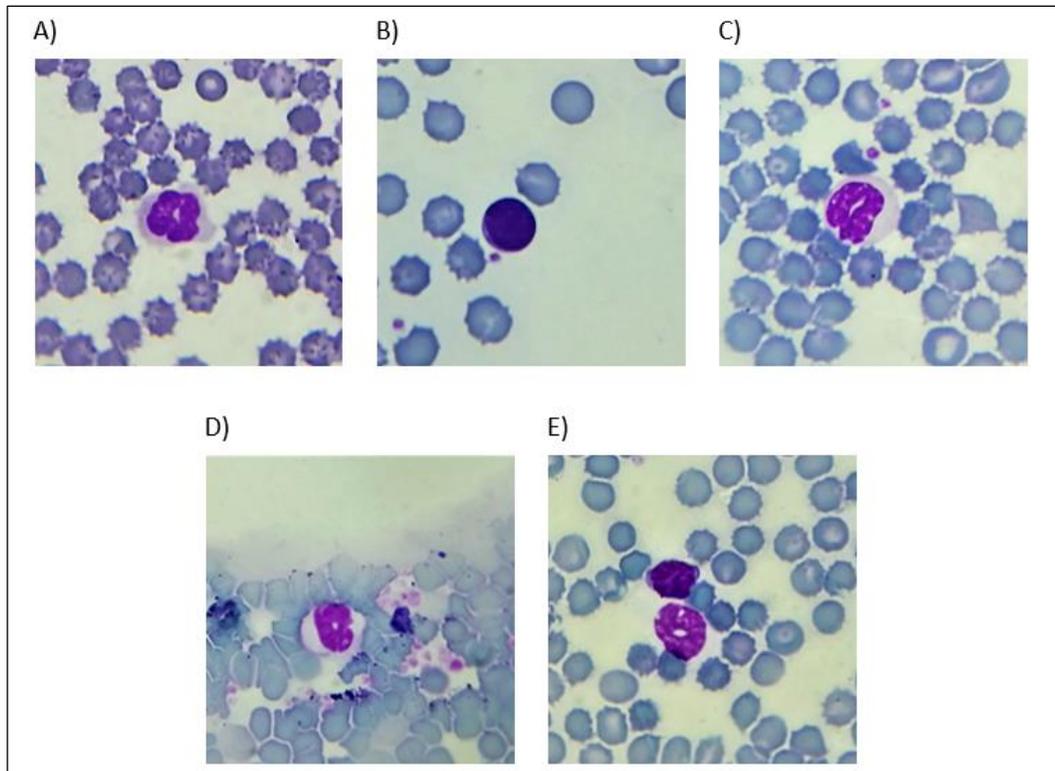


Figura 18. Extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de $AlCl_3$ con tinción citoquímica peroxidasa y contra tinción Wright. A) Grupo A., neutrófilo en banda; B) Grupo B, linfocito; C) Grupo C, neutrófilo en banda; D) Grupo D, neutrófilo en banda; E) Grupo E, linfocito y neutrófilo en banda.

Estas enzimas también están presentes en las células de la serie monocítica (Ayoubi y col., 2016); sin embargo, entre mayor sea la maduración celular, la intensidad de tinción decrece (Merck Millipore, 2017b), siendo esta madurez la causa de la ausencia de reacción en los extendidos.

α -naftil acetato esterasa. Esta reacción de esterasa demuestra diversos grados de actividad citoquímica en la mayoría de las células normales y leucémicas. Las células de la serie monocítica, sin embargo, se caracterizan por una fuerte positividad a la prueba (Ayoubi y col., 2016). Esta prueba ayuda a discernir formas granulocíticas y monocíticas anormales (Aster y Stone, 2017). En la Fig. 19 se aprecia que no se cuenta con una reacción positiva en ninguno de los grupos. Esto es debido a la ausencia de interacción por parte de aluminio en la producción de acetato de 1-naftilo por parte de los leucocitos, en especial de los monocitos.

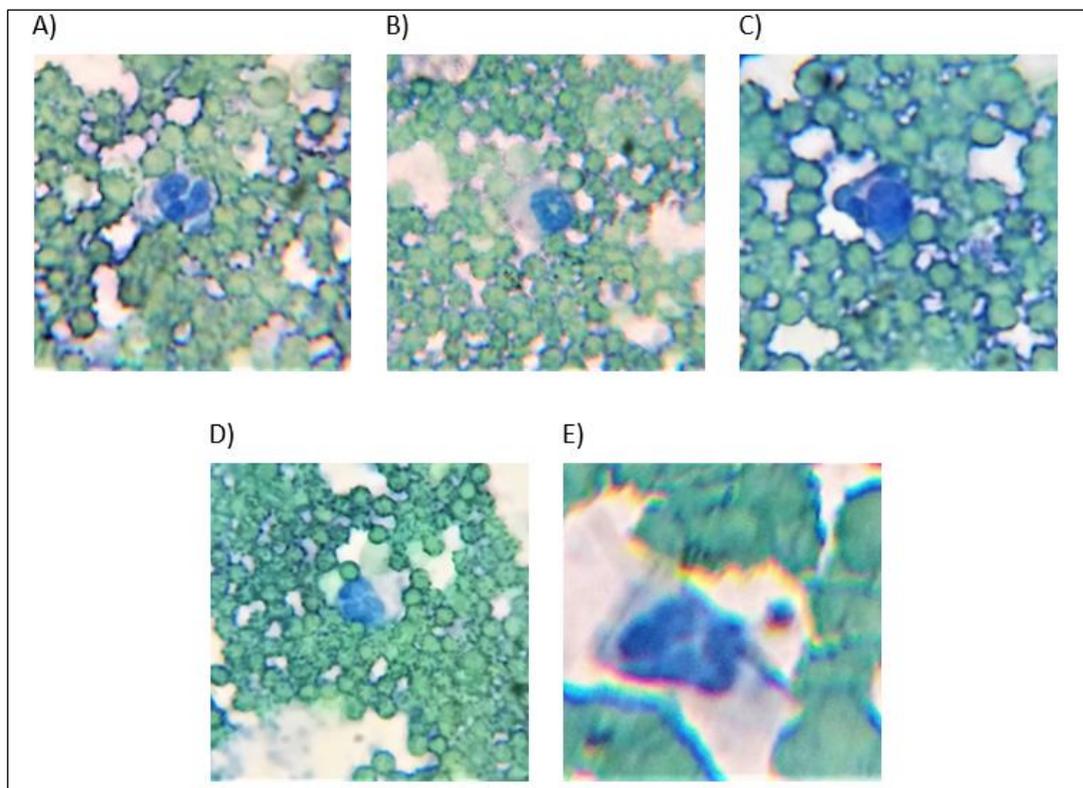


Figura 19. Extendido de sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a concentraciones de $AlCl_3$ con tinción citoquímica de α -naftil acetato esterasa con contra tinción Wright. A) Grupo A., neutrófilo en banda; B) Grupo B, neutrófilo en banda; C) Grupo C, monocito; D) Grupo D, monocito; E) Grupo E, monocito.

CONCLUSIONES

En la determinación de la concentración de aluminio en sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a $AlCl_3$, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos experimentales, es decir, no se detectó bioconcentración de aluminio en sangre a pesar del aumento de concentración en las administraciones intragástricas. Esto puede ser debido a que el aluminio tiene la cualidad de almacenarse en diferentes tejidos como el cerebral, mamario, óseo, entre otros, dejando a la sangre como un sistema para su transporte.

En la determinación del perfil cinético de hierro (hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro, ferritina y saturación de transferrina) y citometría hemática en sangre periférica de ratas Sprague Dawley expuestas a $AlCl_3$, no se encontró diferencia significativa en los resultados entre los grupos de los tratamientos experimentales, debido quizá a que la concentración de $AlCl_3$ o el tiempo de exposición no fue lo suficiente para afectar estos parámetros. En contraste, en la determinación de ferritina se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de esta proteína, para el tratamiento experimental de 40 mg de Al/kg de peso corporal de la rata (grupo E). Es decir, al aumentar la concentración de aluminio disminuye la concentración de ferritina.

En el análisis diferencial de frotis sanguíneo con tinción Wright-Giemsa y marcadores citoquímicos, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos experimentales. Esto es debido a la falta de interacción de los iones de aluminio con la membrana de los eritrocitos o leucocitos, lo que conlleva a una falta de acumulación de aluminio en el tejido sanguíneo y como consecuencia en las células. Esto puede ser debido a diversos factores como la forma de aluminio utilizado ($AlCl_3$); dosis menor a la requerida para provocar efectos nocivos; acumulación en otros órganos; o bien una correcta excreción de aluminio del modelo murino.

Recomendaciones

El presente trabajo se considera como base para el estudio de líneas celulares sanguíneas como lo son los leucocitos y plaquetas, además de fortalecimiento del estudio de eritrocitos provenientes de un modelo de experimentación murino previamente expuesto a aluminio.

Es recomendable se lleve a cabo un estudio con personas que de manera cotidiana estén altamente expuestos a aluminio, lo cual permitiría obtener resultados más claros sobre los efectos de la exposición a aluminio a nivel hematológico.

Así mismo, se recomienda el estudio de las diversas formas en las que se puede estar expuesto a aluminio (sulfato de aluminio, hidróxido de aluminio, cloruro de aluminio, fosfato de aluminio, entre otros) ya que, dependiendo de la forma y vía de entrada al organismo, es la manera en la que se tendrá la acumulación, excreción y efectos en los diversos sistemas.

REFERENCIAS

- Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. 2014. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 19(2): 164-174.
- Abcam. ab157732 – Ferritin (FTL) Rat ELISA Kit. 2016. Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Adekunle-Buraimoh, A., Adeniyi-Ojo, S., Olajide-Hmabolu, J., Adebisi, S.S. 2012. Effects of Aluminium Chloride Exposure on the Histology of the Cerebral Cortex of Adult Wistar Rats. *J Biol Sci.* 3(1): 87-113. 10.5296/jbls.v3i1.1421.
- Akhlaghi, A., Ahmadi-Hamedani, M. 2019. Introducing a combined Leishman-Giemsa stain as a new staining technique for avian blood smears. *Iran J Vet Res.* 20(2): 147-150. 10.22099/IJVR.2019.5266.
- Alkan, F.A., Karis, D., Cakmak, G., Ercan, A.M. 2019. Analysis of the Relationship Between Hemorheologic Parameters, Aluminum, Manganese, and Selenium in Smokers. *Biol Trace Elem Res.* 187: 22-31. doi.org/10.1007/s12011-018-1352-8
- Argote-Cusi, M.L. 2009. Comparación y evaluación de la distribución del estimador de la tasa global de fecundidad de Bolivia. *Papeles de Población.* 15(62): 201-222.
- Aster, J.C., Stone, R.M. 2017. Clinical manifestations and diagnosis of the myelodysplastic syndromes. <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-the-myelodysplastic-syndromes#H27> Fecha de acceso: 27 de Julio de 2019.
- Astudillo, J., Cocioa, R., Ríos, D. 2016. Osteodistrofia renal y trastornos del metabolismo y la mineralización ósea asociados a enfermedad renal crónica: manifestaciones en radiología. *Rev Chil Rad.* 22(1): 27-34.

- Auerbach, M., Adamson, J.W. 2016. How we diagnose and treat iron deficiency anemia. *Am J Hematol.* 9(1): 31-38. 10.1002/ajh.24201.
- Awadallah, S. 2013. Protein Antioxidants in Thalassemia. *Adv Clin Chem.* 60:85-128. 10.1016/B978-0-12-407681-5.00003-9.
- Bakir, A., Darbre, P.D. 2015. Effect of aluminium on migration of oestrogen unresponsive MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *J Inorg Bio.* 152: 180-185. 10.1016/j.jinorgbio.2015.09.001.
- Bazzoni, G.B., Bollini, A.N., Hernández, G.N., Contini, M. del C., Chiarotto, M.M., Rasia, M.L. 2005. In vivo effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane. *J Inorg Biochem.* 99(3): 822-827.
- BioSystems. 2013. Hierro – Cromazurol. Barcelona. España.
- BioSystems. 2016. Capacidad Total de Fijación de Hierro (TIBC). Barcelona. España.
- Bobrowska-Korczak, B., Skrajnowska, D., Tokarz, A. 2012. The effect of dietary zinc - and polyphenols intake on DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. *J Biomed Sci.* 19(1): 43. 10.1186/1423-0127-19-43.
- Bohrer, D., Dessuy, M.B., Kaizer, R., do Nascimento, P.C., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Carvalho, L.M., Garcia, S.C. 2008. Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies. *Anal Biochem.* 377:120-127. 10.1016/j.ab.2008.03.029.
- Borowska, S., Brzóška, M.M. 2015. Metals in cosmetics: implications for human health. *J Appl Toxicol.* 35(6): 551-72. 10.1002/jat.3129.
- Bragadin, M., Manente, S., Scutari, G., Rigobello, M.P., Bindoli, A. 2004. A possible transport mechanism for aluminum in biological membranes. *J Inorg Biochem.* 98(6):1169-1173.

- Buraimoh, A.A., Ojo, S.A. 2014. Effects of Aluminium chloride exposure on the body weight of Wistar rats. *Ann Biol Sci.* 2(2): 66-73.
- Burrell, S.A., Exley, C. 2010. There is (still) too much aluminium in infant formulas. *BMC Pediatr.* 10:63. 10.1186/1471-2431-10-63.
- Cakste, I., Kuka, M., Kuka, P. 2017. Migration of iron, aluminium, calcium, magnesium and silicon from ceramic materials into food simulant. *FoodBalt.* 11: 160-163. 10.22616/foodbalt.2017.025.
- Campuzano, G. 2008. Utilidad del extendido de sangre periférica: las plaquetas. *Medicina & Laboratorio.* 14(11-12): 511-531.
- Cardiano, P., Foti, C., Giacobello, F., Giuffrè, O., Sammartano, S. 2018. Study of Al³⁺ interaction with AMP, ADP and ATP in aqueous solution. *Biophys Chem.* 234: 42-50. 10.1016/j.bpc.2018.01.003.
- CEM Corporation. 2009. Manual de operación de equipo de digestión ácida acelerada por microondas de ultra-alta productividad modelo MARS Xpress. Carolina del Norte, Estados Unidos de América, 91 pp.
- CENAM-EMA. 2008. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Centro Nacional de Metrología-Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. Distrito Federal, México. 17 pp.
- Chappard, D. 2016. Effects of aluminum on cells and tissues. *Morphologie,* 100(329), 49-50. 10.1016/j.morpho.2016.04.00.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., Walz, T. 2004. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell.* 116: 565-576. 10.1016/S0092-8674(04)00130-8.
- Choupani, A., Jafari, M.J., Boghsani, G.T., Azari, M.R., Zendehtdel, R. 2018. Biological monitoring of occupational exposure to dust among aluminium

- foundry workers. *Russ. Open Med. J.* 7(2): e0206. 10.15275/rusomj.2018.0206.
- Crisponi, G., Nuchi, V.M., Faa, G., Remelli, M. 2011. Human diseases related to aluminium overload. *Monatsh Chem.* 142: 331-340. 10.1007/s00706-011-0474-x.
- Crisponi, G., Nurchi, V.M., Bertolasi, V., Remelli, M., Faa, G. 2012. Chelating agents for human diseases related to aluminium overload. *Coord Chem Rev.* 256: 89-104. 10.1016/j.ccr.2011.06.013.
- Crisponi, G., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., Nuchi, V.M., Crespo-Alonso, M., Lachowicz, J.I., Faa, G. 2013. The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases. *Biomol Concepts.* 4(1): 77-87. 10.1515/bmc-2012-0045.
- Da Costa, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Fenneteau, O., Mohandas, N. 2016. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol Dis.* 56(1): 9-22. 10.1016/j.bcnd.2015.09.001.
- Darbre, P.D., Bakir, A., Iskakova, E. 2013. Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Inorg Biochem.* 128(1): 245-249. 10.1016/j.jinorgbio.2013.07.004.
- Darbre, P.D. 2016. Aluminium and the human breast. *Morphologie.* 100(329): 65-74. 10.1016/j.morpho.2016.02.001.
- De Sautu, M., Saffioti, N.A., Ferreira-Gomes, M.S., Rossi, R.C., Rossi, J.P.F.C., Mangialavori, I.C. 2018. Aluminum inhibits the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases by different mechanisms. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1860(8): 1580-1588. 10.1016/j.bbamem.2018.05.014.

- De Sole, P., Rossi, C., Chiarpotto, M., Ciasca, G., Bocca, B., Alimonti, A., Bizzarro, A., Rossi, C., Masullo, C. 2013. Possible relationship between Al/ferritin complex and Alzheimer's disease. *Clin Biochem.* 2013. 46(1-2): 89-93. 10.1016/j.clinbiochem.2012.10.023.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Safety of aluminium from dietary intake, scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). *EFSA Journal* 1–34.
- El Hage Chahine, J.M., Hémadi, M., Ha-Duong, N.T. 2012. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochim Biophys Acta.* 1820(3): 334-47. 10.1016/j.bbagen.2011.07.008.
- Elliott, A.C., Hynan, L.S. 2011. A SAS® macro implementation of a multiple comparison post hoc test for a Kruskal–Wallis analysis. *Comput Methods Programs Biomed.* 102(1): 75-80. 10.1016/j.cmpb.2010.11.002.
- El-Sayed, E.S.A., El-Gammal, M.I., Nassar, S.A., Nassar, S.E. 2016. Hematological, Biochemical and Histopathological Changes on Exposure to Aluminum Dust. *Zagazig Vet J.* 44(2): 106-118.
- Elsayed, M.E., Sharif, M.U., Stack, A.G. 2016. Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker. *Adv Clin Chem.* 75: 71-97. 10.1016/bs.acc.2016.03.002.
- Ertl, K., Goessler, W. 2018. Aluminium in foodstuff and the influence of aluminium foil used for food preparation or short time storage. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 11(2): 153-159. 10.1080/19393210.2018.1442881.
- Exley, C. 2013. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Proc Imp.* 15(10): 1807-1816. 10.1039/c3em00374d.
- Exley, C., Mold, M.J. 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *J Trace Elem Med Biol.* 30: 90-95. 10.1016/j.jtemb.2014.11.002.

- Exley, C. 2016. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*. 100(329): 51-55. 10.1016/j.morpho.2015.12.003.
- Farag, M.R., Alagawany, M. 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chem Biol Interact*. 279: 73-83. 10.1016/j.cbi.2017.11.007.
- Farasani, A., Darbre, P.D. 2015. Effects of aluminium chloride and aluminium chlorohydrate on DNA repair in MCF10A immortalised non-transformed human breast epithelial cells. *J Inorg Biochem*. 152:186-9. 10.1016/j.jinorgbio.2015.08.003.
- Farina, M., Rotta, L.N., Soares, F.A., Jardim, F., Jacques, R., Souza, D.O., Rocha, J.B. 2005. Hematological changes in rats chronically exposed to oral aluminum. *Toxicology*. 209(1):29-37. 10.1016/j.tox.2004.12.005.
- Fernández-Maestre, R. 2014. Aluminio: ingestión, absorción, excreción y toxicidad. *Rev Costarr Salud Pública*. 23(2): 113-118.
- Fulgenzi, A., Vietti, D., Ferrero, M.E. 2014. Aluminium Involvement in Neurotoxicity. *Biomed Res Int*. ID 758323. 5 p. 10.1155/2014/758323.
- Fulgenzi, A., De Giuseppe, R., Bamonti, F., Vietti, D., Ferrero, M.E. 2015. Efficacy of chelation therapy to remove aluminium intoxication. *J Inorg Biochem*. 152: 214-218. 10.1016/j.jinorgbio.2015.09.007.
- García-Alegría, A.M., Astiazarán-García, H.F., Anduro-Corona, I., Burgos-Hernández, A., Ruíz-Bustos, E., Canett-Romero, R., Encinas-Soto, K.K., Gómez-Álvarez, A. 2017. Optimización de las condiciones analíticas ideales para cuantificar aluminio en tejidos de ratas Sprague Dawley mediante la técnica de absorción atómica. *Rev Int Contam Ambie*. 33: 77-84. 10.20937/RICA.2017.33.esp02.07.

- García-Medina, S., Núñez-Betancourt, J.A., García-Medina, A.L., Galar-Martínez, M., Neri-Cruz, N., Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L. 2013. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 96:191-7 10.1016/j.ecoenv.2013.06.010.
- Geyikoglu, F., Türkez, H., Bakir, T.O., Cicek, M. 2012. The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. *Toxicol Ind Health.* 29(9): 780-791. 10.1177/0748233712440140.
- Ghasemi, A., Zahediasl, S. 2012. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *Int J Endocrinol Metab.* 10(2): 468-489. 10.5812/ijem.3505.
- Ghorbel, I., Maktouf, S., Kallel, C., Ellouze Chaabouni, S., Boudawara, T., Zenhal, N. 2015. Disruption of erythrocyte antioxidant defense system, hematological parameters, induction of pro-inflammatory cytokines and DNA damage in liver of co-exposed rats to aluminium and acrylamide. *Chem Biol Interact.* 236: 31-40. 10.1016/j.cbi.2015.04.020.
- Girasole, M., Dinarelli, S., Boumis, G. 2012. Structure and function in native and pathological erythrocytes: A quantitative view from the nanoscale. *Micron.* 43(12): 1273-86 10.1016/j.micron.2012.03.019.
- Glynn, A., Lingnell, S. 2019. Increased urinary excretion of aluminium after ingestion of the food additive sodium aluminium phosphate (SALP) – a study on healthy volunteers. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 13: 1-8. 10.1080/19440049.2019.1626998.
- Gómez, M.S. 2001. Alteraciones neurológicas y psiquiátricas secundarias a la exposición al aluminio. *Cuadernos de Medicina Forense.* 24: 17-24.

- Guo, S., Zhong, S., Zhang, A. 2013. Privacy-preserving Kruskal–Wallis test. *Comput Methods Programs Biomed.* 112(1): 135-45. 10.1016/j.cmpb.2013.05.023.
- Gupta, A. 2014. Ferric Citrate Hydrate as a Phosphate Binder and Risk of Aluminum Toxicity. *Pharmaceuticals.* 7: 990-998. 10.3390/ph7100990.
- Hardisson, A., Revert, C., González-Weller, D., Gutiérrez, Á., Paz, S., Rubio, C. 2017. Aluminium Exposure Through the Diet. *J Food Sci Nutr.* 3:19. 10.24966/FSN-1076/100020.
- HogenEsch, H. 2013. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol.* 10(3): 406. 10.3389/fimmu.2012.00406.
- Iglesias-González, J., Sánchez-Iglesias, S., Beiras-Iglesias, A., Méndez-Álvarez, E., Méndez-Álvarez, R. 2017. Effects of Aluminium on Rat Brain Mitochondria Bioenergetics: an In vitro and In vivo Study. *Mol Neurobiol.* 54: 563-570. 10.1007/s12035-015-9650-z.
- Ivanovski, I., Ivanovski, A., Nikolić, D., Ivanovski, P. 2019. Aluminium in brain tissue in autism. *J Trace Elem Med Biol.* 51:138-140. 10.1016/j.jtemb.2018.10.013.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* 7(2): 60-72. 10.2478/intox-2014-0009.
- Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., Haq, Q.M. 2015. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int J Mol Sci.* 16(12): 29592-29630. 10.3390/ijms161226183.
- Jennrich, P., Schulte-Uebbing, C. 2016. Does Aluminium Trigger Breast Cancer?. *The Open Access J Sci Technol.* 4: 101234, 6 p. 10.11131/2016/101234.

- Kalaiselvi, A., Suganthy, O.M., Govindassamy, P., Vasantharaja, D., Gowri, B., Ramalingam, V. 2014. Influence of Aluminium Chloride on Antioxidant System in the Testis and Epididymis of Rats. *Iranian J Toxicol.* 8(24): 991-997.
- Kisnierienė, V., Lapeikaitė, I. 2015. When chemistry meets biology: the case of aluminium – a review. *Chemija.* 26(3):148-158.
- Klotz, K., Weistenhöfer, W., Neff, F., Hartwig, A., Van Thriel, C., Drexler, H. 2017. The Health Effects of Aluminum Exposure. *Dtsch Arztebl Int.* 114: 653-659. 10.3238/arztebl.2017.0653.
- Kovacik, A., Arvay, J., Tusimova, E., Harangozo, L., Tvrda, E., Zbynovska, K., Cupka, P., Andrascikova, S., Tomas, J., Massanyi, P. 2017. Seasonal variations in the blood concentration of selected heavy metals in sheep and their effects on the biochemical and hematological parameters. *Chemosphere.* 168: 365-371. 10.1016/j.chemosphere.2016.10.090.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V. 2007. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. *J Toxicol Environ Health. Part B: Critical Reviews.* 10: 1-269. 10.1080/10937400701597766.
- Lang, E., Qadri, S.M., Lang, F. 2012. Killing me softly – Suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(8): 1236-1243. 10.1016/j.biocel.2012.04.019.
- Lang, E., Pozdeev, V.I., Xu, H.C., Shinde, P.V., Behnke, K., Hamdam, J.M., Lehnert, E., Scharf, R.E., Lang, F., Häussinger, D., Lang, K.S., Lang, P.A. 2016. Storage of Erythrocytes Induces Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem.* 39(2): 668-676. 10.1159/000445657.
- Lavalle, A.L., Micheli, E.B., Rubio, N. 2006. Análisis didáctico de regresión y correlación para la enseñanza media. *Relime.* 9(3): 383-406.

- León-Bojorge, B. 2010. Biopsia de médula ósea. *Acta Pediatr.* 31(4): 178-187.
- Li, X., Hu, C., Zhu, Y., Sun, H., Li, Y. 2011. Effects of Aluminum Exposure on Bone Mineral Density, Mineral, and Trace Elements in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 143(1): 378-385. 10.1007/s12011-010-8861-4.
- Li, P., Luo, W., Zhang, H., Zheng, X., Liu, C., Ouyang, H. 2016. Effects of Aluminum Exposure on the Bone Stimulatory Growth Factors in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 172(1): 166-71. 10.1007/s12011-015-0569-z.
- Lloret, M.J., Bover, J., DaSilva, I., Furlano, M., Ruiz-García, C., Ayasreh, N., Quílez, B., Díaz, J.M., Ballarín, J.A. 2013. Papel del fósforo en la enfermedad renal crónica. *Nefrología Sup Ex.* 4(2): 2-10.
- Manisha, C., Kumar, J.D., Sandeep, T., Ali, M.A. 2013. Effect of Aluminum on different parts of Brainstem of Old. *Res J Pharmaceutical Sci.* 2(3): 6-11.
- Mashayekhian, M., Hassanian-Moghaddam, H., Rahimi, M., Zamani, N., Aghabiklooei, A., Shadnia, S. 2016. Elevated Carboxyhaemoglobin Concentrations by Pulse CO-Oximetry is Associated with Severe Aluminium Phosphide Poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 119(3):322-329. 10.1111/bcpt.12571.
- Massanyi, P., Stawarz, R., Halo, M., Formicki, G., Lukac, N., Cupka, P., Schwarcz, P., Kovacik, A., Tusimova, E., Kovacik, J. 2014. Blood concentration of copper, cadmium, zinc and lead in horses and its relation to hematological and biochemical parameters. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 49(8): 973-9. 10.1080/10934529.2014.894322.
- Maya, S., Prakash, T., Maghu, K.D., Goli, D. 2016. Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomed Pharmacother.* 83: 746-754. 10.1016/j.biopha.2016.07.035

- Merck Millipore. 2017a. LEUCOGNOST®-ALPA Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos. Billerica, MA, USA.
- Merck Millipore. 2017b. LEUCOGNOST® POX Detección de la reacción de la peroxidasa en leucocitos. Billerica, MA, USA.
- Merck Millipore. 2017c. LEUCOGNOST® EST Identificación de la reacción de α -acetato de naftiloesterasa en leucocitos. Billerica, MA, USA.
- Miller J.N., Miller J.C. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Prentice Hall. p. 115. Madrid, España.
- Minshall, C., Nadal, J., Exley, C. 2014. Aluminium in human sweat. *J Trace Elem Med Biol.* 28(1): 87-88. 10.1016/j.jtemb.2013.10.002.
- Mirza, A., King, A., Troakes, C., Exley, C. 2016. The Identification of Aluminum in Human Brain Tissue Using Lumogallion and Fluorescence Microscopy. *J Alzheimers Dis.* 54(4): 1333-1338. 10.3233/JAD-160648.
- Mohamed, N.E., Abd El-Moneim, A.E. 2017. Ginkgo biloba extract alleviates oxidative stress and some neuro transmitters changes induced by aluminum chloride in rats. *Nutrition.* 35: 93-99. 10.1016/j.nut.2016.10.012
- Mujika, J.I., Lopez, X., Rezabal, E., Castillo, R., Marti, S., Moliner, V., Ugalde, J.M. 2011. A QM/MM study of the complexes formed by aluminum and iron with serum transferrin at neutral and acidic pH. *J Inorg Biochem.* 105(11): 1446-1456. 10.1016/j.jinorgbio.2011.07.019 .
- Mujika, J.I., Rezabal, E., Mercero, J.M., Ruipérez, F., Costa, D., Ugalde, J.M., Lopeza, X. 2014. Aluminium in Biological Environments: A Computational Approach. *Comput Struct Biotechnol J.* 9: e201403002. 10.5936/csbj.201403002.

- Nelva, J.J.C., Benedetti, A.L., Tanaka, S.M.C.N., Santos, J.I., D'Amico, E.A. 2002. Determination of serum aluminum, platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients. *Braz J Med Biol Res.*35: 345-350.
- Ortho-Clinical Diagnostics, 2004. VITROS DT60 II. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Ortho-Clinical Diagnostics. 2003. VITROS Láminas de Fe DT. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Osman, H.M., Shayoub, M.E., Babiker, E.M., Osman, B., Elhassan, A.M. 2012. Effect of Ethanolic Leaf Extract of *Moringa oleifera* on Aluminum-induced Anemia in White Albino Rats. *J Biol Sci Title.* 5(4): 255-260.
- Oztürk, B., Ozdemir, S. 2015. Effects of aluminum chloride on some trace elements and erythrocyte osmotic fragility in rats. *Toxicol Ind Health.* 31(12):1069-77. 10.1177/0748233713486956.
- Pandey, G., Jain, G.C. 2013. A review on toxic effects of aluminium exposure on male reproductive system and probable mechanisms of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 3(3): 48-57.
- Pari, L., Karthikeyan, A., Karthika, P., Rathinam A. 2014. Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. *Toxicol Rep.* 2: 46-55. 10.1016/j.toxrep.2014.11.003.
- Patel, M., Ramavataram. D.V.S.S. 2012. Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation. *Indian J Clin Biochem.* 27(4): 322-332. 10.1007/s12291-012-0250-7.
- Perkin Elmer. 2012. Manual de operación de equipo de espectroscopía de absorción atómica modelo AAnalyst 400. México, D. F., México, 98 pp.

- Pineau A., Fauconneau, B., Sappino, A.P., Deloncle, R., Guillard, O. 2014. If exposure to aluminium in antiperspirants presents health risks, its content should be reduced. *J Trace Elem Med Biol.* 28(2): 147-150. 10.1016/j.jtemb.2013.12.002.
- Rao, T.V.R.K., Kumar, A. 2015. In-vitro Aluminium Uptake by the Bone and its Effect on Bone Mineral. *Br Biomed Bull.* 3(1): 113-123.
- Rodríguez, J., Mandalunis, P.M. 2018. A Review of Metal Exposure and Its Effects on Bone Health. *J Toxicol.* 4854152. 10.1155/2018/4854152.
- SAGARPA. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura y Ganadería y Desarrollo Rural. *Diario Oficial de la Federación.* 22 de agosto de 2001.
- SAGARPA. 2014. Norma Oficial Mexicana NOM-033- ZOO-2014. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Secretaría de Agricultura y Ganadería y Desarrollo Rural. *Diario Oficial de la Federación.* 26 de agosto de 2015.
- SEAC. 1999. Fotómetro de química clínica modelo QC Diagnostics. Castelnuovo Don Bosco. Italia.
- Secretaría de Economía. 2015. Norma Mexicana NMXAA-115-SCFI-2015. Análisis de agua – Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos. *Secretaría de Economía. Diario Oficial de la Federación.* 16 de octubre de 2015..
- Sermini, C.G., Acevedo, M.J., Arredondo, M. 2017. Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 34(4): 690-698. 10.17843/rpmesp.2017.344.3182.

- Sharma, S., Sharma, D., Sharma S., Rajawat, A., Jain, S., Upreti, N., Yadav, A., Pandey, A., Sharma, K.P. 2010. Comparative study on acute toxicity of fluoride, aluminium and aluminium fluoride to swiss albino mice. *Australas J Ecotoxicol.* 16: 41-47.
- Sharma, S., Sharma, K.P., Sharma, S. 2016. Role of Spirulina in mitigating hemato-toxicity in Swiss albino mice exposed to aluminum and aluminum fluoride. *Environ Sci Pollut Res.* 23: 25280-25287. 10.1007/s11356-016-7718-6.
- Shaw, C.A., Tomljenovic, T. 2013. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res.* 56(1): 204-316. 10.1007/s12026-013-8403-1.
- Shrivastava, B., Dipak, N.K., Karajagi, A., Dosi, R. 2018. Severe neonatal hypercalcemia secondary to Aluminium toxicity. *Int J Contemp Pediatrics.* 5(1): 254-256. 10.18203/2349-3291.ijcp20175595.
- Sivakumar, S., Sivasubramanian, J., Prasad-Khatiwada, C., Manivannan, J., Raja, B. 2013. Determination of aluminium induced metabolic changes in mice liver: A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Spectrochim Acta A.* 110: 241-248. 10.1016/j.saa.2013.03.056.
- Skarabhatava, A.S., Lukyanenko, L.M., Slobozhanina, E.I., Falcioni, M.L., Orlando, P., Silvestri, S., Tiano, L, Falcioni, G. 2015. Plasma and mitochondrial membrane perturbation induced by aluminum in human peripheral blood lymphocytes. *J Trace Elem Med Biol.* 31: 37-44. 10.1016/j.jtemb.2015.02.002.
- Stahl, T., Taschan, H., Brunn, H. 2011. Aluminium content of selected foods and food products. *H. Environ Sci Eur.* 23: 37. 10.1186/2190-4715-23-37.

- Sun, X., Cao, Z., Zhang, Q., Li, M., Han, L., Li, Y. 2016. Aluminum trichloride inhibits osteoblast mineralization via TGF- β 1/Smad signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 244: 9-15. 10.1016/j.cbi.2015.11.027.
- Susantitaphong, P., Tiranathanagul, K., Katavetina, P., Praditpornsilpa, K., De Broe, M.E., D'Haese, P.C., Eiam-Ong, S. 2014. Effect of aluminum on markers of bone formation resorption in chronic hemodialysis patients. *Asian Biomedicine.* 8(4): 485-492. 10.5372/1905-7415.0804.317.
- Tentoni, J., Polini, N.N., Casanave, E.B. 2007. Citoquímica Hematológica en el Mamífero Autóctono *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Dasypodidae). *Hematología.* 11(3): 216-219.
- Terry, N.R., Mendoza, C.A. 2017. Importancia del estudio del frotis de sangre periférica en ancianos. *Medisur.* 15(3): ISSN 1727-897X.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. 2002. International union of pure and applied chemistry technical report. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem.* 74 (5), 835-855.
- Torrellas, R. 2012. La exposición al aluminio y su relación con el ambiente y la salud. *Revista Tecnogestión.* 9(1): 3-11.
- Tsai, M.H., Fang Y.W., Liou, H.H., Leu, J.G., Lin, B.S. 2018. Association of Serum Aluminum Levels with Mortality in Patients on Chronic Hemodialysis. *Sci Rep.* 8:16729. 10.1038/s41598-018-34799-5.
- Turgut, G., Kaptanoğlu, B., Turgut, S., Enli, Y., Genç, O. 2004. Effects of Chronic Aluminium Administration on Blood and Liver Iron-Related Parameters in Mice. *Yonsei Medical Journal.* 45(1): 135-139.
- Türkez, H., Yousef, M.I., Geyikoglu, F. 2010. Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 48(10): 2741-2746. 10.1016/j.fct.2010.06.049.

- U.S. Department of Health and Human Services. 2008. Toxicological profile for aluminum. Division of Toxicology and Environmental Medicine. Program and Service. Washington, EUA.
- Ugbaja, R.N., Olaniyan, T.O., Afolabi, O.K., Onunkwor, B.O., Dosumu, O.A., Akinhanmi, T.F., Tihamiyu, A.Y., Aliyu-Banjo, N.O. 2017. Ionoregulatory Disruption and Acetylcholinesterase Activity in Aluminium Toxicity: Effects of Vitamins C and E. *Niger J Physiol Sci.* 32(2): 207-212.
- Veiga, M., Bohrer, D., Banderó, C.R., Oliveira, S.M., do Nascimento, P.C., Mattiazzi, P., Mello, C.F., Lenz, Q.F., Oliveira, M.S. 2013. Accumulation, elimination, and effects of parenteral exposure to aluminum in newborn and adult rats. *J Inorg Biochem.* 128: 215-20. 10.1016/j.jinorgbio.2013.07.028.
- Veríssimo, M.I., Gomes, M.T. 2008. Aluminium migration into beverages: Are dented cans safe. *Sci Total Environ.* 405(1-3): 385-388. 10.1016/j.scitotenv.2008.05.04.
- Vilchèze, C., Hartman, T., Weinrick, B., Jacobs W.R. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nat Commun.* 4:188 10.1038/ncomms2898.
- Vota, D.M., Crisp, R.L., Nesse, A.B., Vittori, D.C. 2012. Oxidative Stress Due to Aluminum Exposure Induces Eryptosis Which Is Prevented by Erythropoietin. *J Cell Biochem.* 113(5): 1581-1589. 10.1002/jcb.24026.
- Watson, B.R., White, N.A., Taylor, K.A., Howes, J.M., Malcor, J.D., Bihan, D., Sage, S.O. 2016. Farndale RW1, Pugh NZinc is a transmembrane agonist that induces platelet activation in a tyrosine phosphorylationdependent manner. *Metallomics.* 8: 91-100. 10.1039/c5mt00064e.
- Wiwanitkit, V. 2006. Molecular Structure of Human Transferrin – Transferrin Receptor Complex. *Int J Mol Sci.* 7(7): 197-203. 10.3390/i7070197.

- Wong, W.W., Chung, S.W., Kwong, K.P., Yin Ho, Y., Xiao, Y. 2010. Dietary exposure to aluminium of the Hong Kong population. 27(4): 457-63. 10.1080/19440040903490112.
- Xue, S., Zhu, F., Kong, X., Wu, C., Huang, L., Huang, N., Hartley, W. 2016. A review of the characterization and revegetation of bauxite residues (Red mud). *Environ Sci Pollut Res.* 23:1120-1132. 10.1007/s11356-015-4558-8
- Yahaya, M.I., Shehu, A., Dabai, F.G. 2013. Efficiency of Extraction of Trace metals from Blood samples using Wet Digestion and Microwave Digestion Techniques. *J Appl Sci Environ Manage.* 17(3): 365-369.
- Yellamma, K., Saraswathamma, S., Nirmala, B. 2010. Cholinergic System Under Aluminium Toxicity in Rat Brain. *Toxicol Int.* 17(2): 106-112. 10.4103/0971-6580.72682.
- aYuan, C., Lee, Y. 2012. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci.* 19:51. 10.1186/1423-0127-19-51.
- Zhang, L., Li, X., Gu, Q., Zhu, Y., Zhao, H., Li, Y., Zhang, Z. 2011. Effects of Subchronic Aluminum Exposure on Serum Concentrations of Iron and Iron Associated Proteins in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 141: 246-253. 10.1007/s12011-010-8725-y.
- Zhang, Q., Cao, Z., Sun, X., Zuang, C., Huang, W., Li, Y. 2016. Aluminum Trichloride Induces Hypertension and Disturbs the Function of Erythrocyte Membrane in Male Rats. *Biol Trace Elem Res.* 171(1): 116-123. 10.1007/s12011-015-0504-3.
- Zhu, Y., Li, X., Chen, C., Wang, F., Li, J., Hu, C., Li, Y., Miao, L. 2012. Effects of aluminum trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats. *Food Chem Toxicol.* 50(8): 2911-2915. 10.1016/j.fct.2012.05.041.

