

Acúmulo de aluminio en presencia de función renal normal: riesgo de intoxicación por vía oral

C. Gómez Alonso, J. L. Fernández Martín, P. Menéndez Rodríguez, I. Fernández Soto, M. J. Virgós y J. B. Cannata

Unidad de Investigación. Metabolismo Oseo y Mineral. Hospital General de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo (Asturias).

RESUMEN

El aluminio es un conocido tóxico en pacientes con insuficiencia renal crónica; sin embargo, no ha sido suficientemente valorado en presencia de función renal normal.

En el presente trabajo se estudian 15 ratas con diverso grado de exposición alúminica crónica (doce meses $Al(OH)_3$ vía oral o $AlCl_3$ intraperitoneal y control). Se detalla un método de determinación de aluminio en tejidos mediante espectrometría de absorción atómica, cuyos resultados demuestran que es válido para diferenciar los distintos grados de exposición al aluminio.

En las ratas con función renal normal expuestas a aluminio por vía intraperitoneal, los niveles de aluminio sérico, urinario y tisular fueron comparables a los existentes en modelos de insuficiencia renal crónica e intoxicación alúminica. Además, en el grupo con exposición oral se observan elevaciones significativas de aluminio sérico, urinario y tisular, y alteraciones del comportamiento. El patrón de distribución del aluminio tisular fue similar al del grupo con exposición intraperitoneal. La cuantificación de aluminio en orina de veinticuatro horas fue el parámetro no invasivo que mostró la mejor correlación con los niveles tisulares de aluminio y con el grado de exposición a este elemento.

El presente trabajo demuestra el riesgo de intoxicación oral por aluminio aun con función renal normal.

Palabras clave: **Absorción de aluminio. Intoxicación por toxicidad de aluminio. Aluminio por vía oral. Aluminio en tejidos con función renal normal. Aluminio y comportamiento.**

ALUMINIUM (Al) BODY BURDEN WITH NORMAL RENAL FUNCTION (NRF): RISK OF ORAL INTOXICATION

SUMMARY

Aluminium hydroxide ($Al(OH)_3$) has become one of the most important sources of Al in renal patients. However this compound is widely used as antacid in patients with NRF without taking into account the likely risk of Al intoxication.

The aim of this study has been to evaluate the long term risk of aluminium accumulation in animals with NRF having intraperitoneal (ip) and oral aluminium exposure. During 12 months, 5 rats were exposed to ip AlCl_3 (10 mg/week; group I), 5 rats received 40 mg/day of $\text{Al}(\text{OH})_3$ through a gastroesophageal catheter (proportional to clinical dose; group II). During this experiment serum and urinary aluminium was investigated and at the end, after sacrifice, we measured Al in tissues using high pressure teflon reactors and Atomic Absorption Spectrometry.

As we expected, those rats receiving AlCl_3 ip showed the greatest increase of aluminium in serum, urine and tissues (bone, liver and heart $p < 0,01$; brain $p < 0,05$). In addition, both oral and ip exposed rats showed significant alteration in their behaviour compared with controls. The most striking results were that rats exposed to oral $\text{Al}(\text{OH})_3$ showed important increases of aluminium in comparison with controls (despite their NRF). urine ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) 3.55 ± 3.8 vs 0.11 ± 0.03 ; serum ($\mu\text{g}/\text{l}$) 20.3 ± 15.8 vs 11 ± 4.2 ; bone ($\mu\text{g}/\text{g}$) 9.6 ± 11.9 vs 1.1 ± 0.2 ($p < 0.01$), brain ($\mu\text{g}/\text{g}$) 1.16 ± 0.5 ($p < 0.05$); it was higher but not significantly so in liver 4.4 ± 0.3 vs 0.4 ± 0.1 . Urinary aluminium was the best index of both, aluminium exposure and aluminium deposition in tissues. This results draws attention about the real risk of oral Al toxicity even with NRF.

Key words: Aluminium absorption. Oral aluminium toxicity. Aluminium in tissues. Aluminium and behaviour. Aluminium toxicity with normal renal functions.

Introducción

La historia toxicológica del aluminio ha estado estrechamente vinculada al desarrollo de la investigación nefrológica. A pesar de que la primera descripción clínica que lo involucra como agente nosológico en un cuadro neuropático se realizó en 1921¹, hasta la década de los setenta no se realizaron estudios que establecieron definitivamente su vinculación patogénica con la encefalopatía dialítica y la osteomalacia fracturante^{2,4}. Una vez identificado como elemento tóxico se iniciaron estudios que permitieron definir los órganos y sistemas involucrados en la intoxicación aluminica, fundamentalmente sistema nervioso central, hueso, paratiroides y sistema eritropoyético, así como las diversas fuentes de exposición al aluminio^{5,6}.

Si bien la contaminación aluminica de las soluciones de diálisis fue la principal fuente de exposición al aluminio, la utilización de técnicas adecuadas en la manufacturación de las mismas ha convertido a la ingesta de hidróxido de aluminio en una fuente de exposición y toxicidad importante⁷. En pacientes con insuficiencia renal crónica, las elevaciones de aluminio sérico y su acumulación tisular han sido consideradas siempre como consecuencia de la reducida capacidad de excreción de este elemento por vía renal. No obstante, este compuesto se comenzó a utilizar como antiácido hace más de cincuenta años, sin que hasta la actualidad se haya valorado el riesgo de intoxicación por esta vía al considerar que la función renal normal garantizaría la eliminación de la escasa fracción de aluminio absorbible por vía oral⁸. Este porcentaje de absorción puede incrementarse notablemente con descensos del pH gastroduodenal, situación en la que se encuentran la mayoría de los pacientes con

úlceras gastroduodenales, consumidores crónicos de antiácidos por excelencia⁹.

Los objetivos de este estudio fueron: a) poner a punto técnicas analíticas que permitan cuantificar diferentes grados de acumulo tisular de aluminio; b) valorar el riesgo de intoxicación intraperitoneal y oral por aluminio en presencia de función renal normal, poniendo especial énfasis en la cuantificación tisular de aluminio y en la correlación entre la concentración cerebral y el comportamiento de los animales.

Material y métodos

Se estudiaron 15 ratas Wistar hembra con función renal normal (BUN al final del estudio de $32,2 \pm 6,1$), divididas en tres grupos.

Grupo I (n = 5): Control. Sin exposición al aluminio (excepto la inevitable exposición ambiental de la dieta y el agua de bebida, $280 \mu\text{g}/\text{g}$ y $80 \mu\text{g}/\text{l}$, respectivamente).

Grupo II (n = 5): Exposición oral a $\text{Al}(\text{OH})_3$, 40 mg/día de $\text{Al}(\text{OH})_3$, administrado por sonda endodigestiva.

Grupo III (n = 5): Exposición intraperitoneal a AlCl_3 (2 mg/día, cinco días/semana).

El período de exposición al aluminio fue de doce meses y se inició cuando los animales tenían tres meses de edad. A lo largo de la experiencia se realizaron determinaciones seriadas de aluminio sérico y urinario. El estudio final de los niveles de aluminio sérico y urinario fue precedido de la suspensión de la administración del mismo durante cuarenta y ocho horas. Al final del mismo, antes del sacrificio de los animales, fueron sometidos a un test del comportamiento de campo abierto¹⁰.

Dicho test permite valorar la capacidad de exploración

y la actividad motora de la rata ante un medio extraño y las posibles modificaciones bajo influencias hormonales o medicamentosas^{11,12}. El test se realizó en un recinto cuadrado (1 m × 1 m) con paredes negras y piso de color blanco dividido en cuadrículas de 20 cm de lado. Este recinto se encuentra intensamente iluminado en su parte central, en la que se sitúa al animal al comienzo de la experiencia. A partir de ese momento, a lo largo de cuatro minutos, todos los movimientos de la rata son contabilizados por dos observadores de forma independiente, efectuando diferentes tipos de mediciones de su actividad motora, de los cuales los de mayor interés son: 1) Tiempo de latencia: mide el tiempo que el animal tarda en salir de la zona central a la periferia, es decir, el tiempo que tarda en resguardarse o adoptar su posición habitual. 2) Tiempo de permanencia en la zona centro: añade al tiempo de latencia las veces que el animal vuelve a la zona central. 3) Defecación: se contabiliza el número de bolas de heces que el animal realiza a lo largo del test.

Después de la realización del test se sacrificó a los animales cuantificando aluminio en tejidos (hueso, hígado, corazón y cerebro).

La recogida de muestras se realizó siguiendo normas establecidas para evitar la contaminación, utilizando recipientes de poliestireno cristalino y conservación a -20° C hasta el momento de efectuar la determinación analítica¹³. Las determinaciones de aluminio y la preparación de las muestras fueron realizadas en habitación con atmósfera controlada en la que se garantizan menos de 100 partículas de polvo/m³ (clase 100). La disolución de los tejidos se llevó a cabo en reactores de teflón a alta presión. A un peso exacto de muestra (entre 0,2-1 g) se añadió 1 ml de ácido nítrico concentrado (Merck Suprapur®). Una vez perfectamente cerrados los reactores se mantuvieron en estufa a 90° C durante tres horas y a 120° C durante otras tres horas. Una vez atacado el tejido fue diluido hasta 25 ml con agua ultrapura (NANOpure II®, Barnstead). La determinación de aluminio se llevó a cabo mediante espectrometría de absorción atómica (modelo Zeeman-3030, Perkin Elmer®. Horno de grafito, modelo HGA-600. Muestreador automático, modelo AS-60)¹⁴. Esta técnica posee un límite de detección de 1 µg/l y el rango de linealidad va desde el límite de detección hasta 70 µg/l. No se producen interferencias de matriz cuando la medida se realiza en la modalidad de área de pico. La detección de la señal de absorción producida se realiza a una longitud de onda de 309,3 nm.

El proceso de datos y análisis estadístico se realizó con soporte informático, utilizando el programa «Sigma» (Horus Hardware®). Todas las variables presentaron una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov). Una vez demostrada la normalidad se realizó el análisis de la varianza respecto a los tres grupos de estudio. Se utilizó el test de comparación de medias (T de Student, con corrección de Welch cuando no existía uniformidad de la varianza) para valorar las diferencias intergrupo. En el

caso de que el valor de la T de Student estuviese en límites de significación, dada la dificultad para aumentar el número de casos por el tiempo de exposición, se utilizaron test no paramétricos (Kruskall-Wallis, Mann-Whitney) para valorar las diferencias y significación.

Resultados

Durante la realización del trabajo, nuestro laboratorio participó en un estudio europeo de control de calidad de las determinaciones analíticas de aluminio («Trace Element Quality Assessment Scheme»), alcanzando un elevado grado de linealidad (fig. 1).

Transcurrido un año de exposición al aluminio se obtuvo un incremento en la concentración de aluminio tisular y en fluidos en los grupos expuestos comparados con el grupo control (tabla I). Las ratas que recibieron AlCl₃ parenteral mostraron aumentos significativos de aluminio en suero, orina y tejidos. Las ratas expuestas a Al(OH)₃ por vía oral tuvieron incrementos más moderados, que llegaron a ser significativos en suero, orina y hueso. Las correlaciones encontradas entre los niveles de aluminio en fluidos biológicos y aluminio tisular se reflejan en la tabla II, siendo el aluminio excretado en orina de veinticuatro horas el parámetro no invasivo que mostró mejor correlación con los niveles de Al tisular (fig. 2). La distribución de aluminio por órganos siguió un patrón similar en los dos grupos expuestos, a pesar de la diferencia en concentraciones absolutas (fig. 3).

Los resultados del test de campo abierto, expresados en la tabla III, demuestran que las ratas expuestas al aluminio por vía oral tuvieron alteraciones del comportamiento significativas (mayor tiempo de latencia, mayor tiempo en zona central y mayor número de deposiciones) y superponibles a las encontradas en las ratas intoxicadas por vía intraperitoneal, a pesar de que las concentraciones de aluminio sérico y tisular de este grupo se

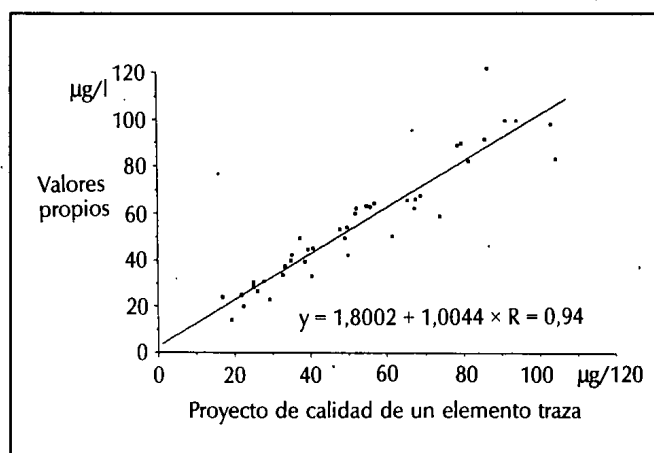


Fig. 1.—Control de calidad de las determinaciones de aluminio. Valores expresados en µg/l.

Tabla I. Aluminio en suero, orina y tejidos en los tres grupos experimentales. Valores expresados como media \pm desviación estándar

	Control	Exp. oral	Exp. ip
Suero ($\mu\text{g/l}$)	11,04 \pm 4,24	20,32 \pm 15,8 ^a	184,4 \pm 102 ^A
Orina ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)	0,11 \pm 0,03	3,55 \pm 3,80 ^{b B'}	84,2 \pm 16,1 ^B
Hueso ($\mu\text{g/g}$)	1,13 \pm 0,29	9,62 \pm 11,9 ^c	63,7 \pm 16,5 ^C
Hígado ($\mu\text{g/g}$)	0,47 \pm 0,19	4,40 \pm 8,50	44,6 \pm 15,1 ^D
Corazón ($\mu\text{g/g}$)	0,72 \pm 0,20	0,40 \pm 0,30	2,5 \pm 0,84 ^E
Cerebro ($\mu\text{g/g}$)	0,51 \pm 0,33	1,16 \pm 0,80 ^f	1,8 \pm 0,80 ^F

Significación estadística (A, D, E): $p < 0,01$ ip vs. control y vs. oral.
 (B, C) $p < 0,001$ ip vs. control y vs. oral.
 (B') $p < 0,05$ oral vs. control.
 (F) $p < 0,05$ ip vs. control.
 (a, b, c) $p < 0,01$ oral vs. control.
 (f) $p < 0,05$ oral vs. control.
 En mayúsculas T de Student y en minúsculas U de Mann-Withney.

Tabla II. Coeficientes de correlación entre los niveles de aluminio en fluidos biológicos y tejidos

Aluminio	Orina	Hueso	Hígado	Corazón	Cerebro
Suero	0,75*	0,70*	0,89*	0,79*	—
Orina		0,88*	0,87*	0,82*	—
Hueso			0,84*	0,74*	0,61**
Hígado				0,81*	—

* $p < 0,01$.
 ** $p < 0,05$.

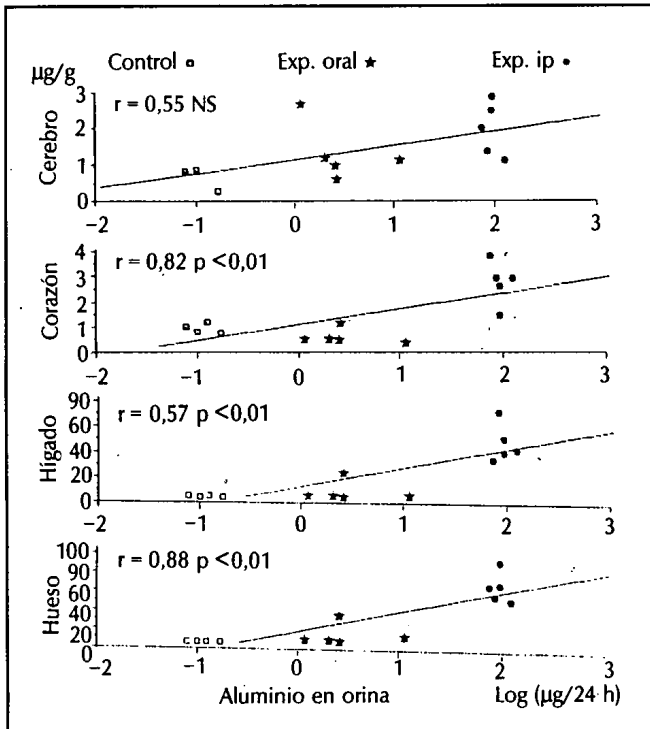


Fig. 2.—Relación entre niveles de aluminio tisular ($\mu\text{g/g}$) y aluminio en orina ($\mu\text{g}/24\text{ h}$) en los tres grupos experimentales, con su coeficiente de correlación y grado de significación. Escala semilogarítmica (log Al orina).

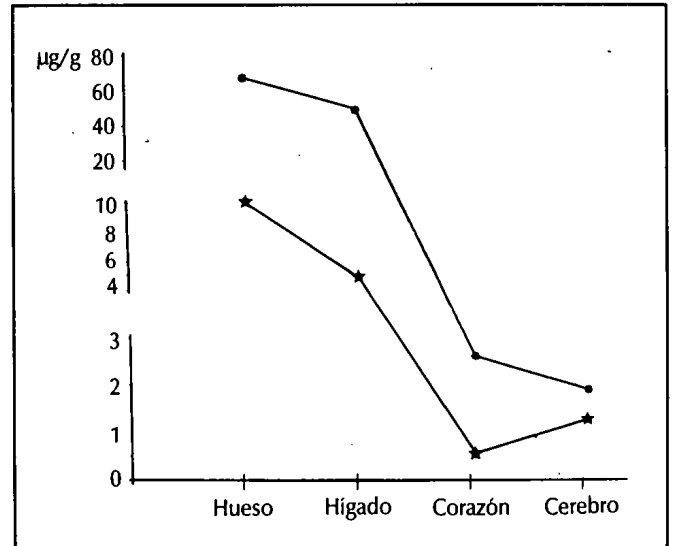


Fig. 3.—Patrón de distribución tisular de aluminio en los grupos de exposición oral (*) e intraperitoneal (•). Valores expresados en $\mu\text{g/g}$.

encontraban en límites de significación estadística (significativo con test no paramétricos) con los del grupo control, claramente diferenciados éstos respecto a los expuestos por vía intraperitoneal.

Tabla III. Resultados del test del campo abierto y determinaciones de aluminio cerebral. Diferencias estadísticas de cada grupo respecto al grupo control

	Control	Oral	Exp. ip
Al cerebro ($\mu\text{g/g}$)	0,51 \pm 0,3	1,16 \pm 0,8 [®]	1,8 \pm 0,8 ^{**}
T.º de latencia (seg)	6,57 \pm 4,39	170 \pm 109 ^{**}	135 \pm 98 [*]
T.º zona centro (seg)	8 \pm 6,5	170 \pm 107 ^{**}	141 \pm 92 ^{**}
Defecación (n.º bolas)	1,1 \pm 2,19	4,8 \pm 2,7 [*]	3,2 \pm 2,04

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ test paramétricos; [®] $p < 0,05$ Mann-Whitney.

Discusión

La intoxicación por aluminio conlleva un grave riesgo de alteraciones a nivel de sistema nervioso central, metabolismo osteomineral y eritropoyesis¹⁵⁻¹⁸. Los resultados de este trabajo llaman la atención sobre dos aspectos fundamentales: la importancia de la metodología utilizada y el riesgo real de acumulación de aluminio, con la administración oral del mismo en presencia de función renal normal.

En relación con el primer punto es importante reseñar que la metodología empleada para la cuantificación de aluminio tisular introdujo variaciones respecto a las descritas en la literatura^{19,20}, como son la disolución de los tejidos en reactores de teflón a alta presión que permiten la utilización de un volumen constante y exacto de ácido nítrico a elevada temperatura, sin riesgo de evaporación, haciendo innecesaria, por la presión y temperatura alcanzadas, la homogeneización previa de los tejidos (incluso el hueso). La determinación en tejido fresco podría condicionar una cierta variabilidad del resultado en función de la humedad de la muestra; sin embargo, la menor manipulación de la misma disminuye una posible contaminación de la muestra. Como refleja la figura 1, la excelente linealidad que mantuvieron nuestros resultados en el control europeo de calidad garantiza la precisión analítica de las determinaciones. Este método, más económico y asequible que aquellos que son llevados a cabo previa liofilización y homogeneizado de las muestras, ha mostrado su eficacia para el estudio de diferentes estados de exposición al aluminio, incluso con elevaciones moderadas de este elemento.

En segundo término, de mayor trascendencia e implicaciones prácticas, es importante resaltar que la administración oral crónica de $\text{Al}(\text{OH})_3$ se acompañó de incrementos en la concentración de aluminio no sólo en suero y orina, sino también en tejidos, a pesar de la función renal normal (tabla I). Estos acúmulos tisulares guardan la misma relación de proporcionalidad que los observados en el grupo de exposición intraperitoneal (fig. 3) y los descritos en pacientes con encefalopatía dialítica (hueso, hígado, músculo y cerebro, en este orden)²¹. Los incrementos de aluminio en orina de ambos grupos indican que la eliminación renal del aluminio es adecuada y que éste no sería el motivo del excesivo acúmulo de

aluminio en los tejidos. Además, como se observa en la figura 2, la cuantificación de aluminio en orina de veinticuatro horas muestra una excelente correlación con el grado de exposición y los acúmulos tisulares de aluminio. Si bien aluminio sérico y urinario muestran una regresión lineal múltiple similar con los tejidos ($r = 0,9$; $p < 0,01$), la capacidad de correlación del urinario respecto al hueso, órgano diana clave en el acúmulo de aluminio, es claramente superior ($r^2 = 0,77$ vs. $r^2 = 0,49$).

Tanto el acúmulo tisular como la excreción renal de aluminio están condicionados por las características farmacocinéticas del mismo, que determinan su distribución pluricompartimental (comportándose cada tejido como un compartimento distinto) y su eliminación como resultado de un equilibrio entre la fracción absorbida, fracción distribuida tisularmente y fracción plasmática. En base a este modelo resulta razonable que el comportamiento de los tejidos haya sido paralelo en los dos grupos expuestos, siendo la diferencia de magnitud entre ambos consecuencia del diferente grado de exposición (fig. 3).

Es muy importante señalar que la posología habitual de los alcalinos, administrados cada seis-ocho horas, se acerca mucho a la vida media del aluminio (cinco horas)²², con lo cual el factor de acumulación en posología cada seis-ocho horas sería muy superior al del presente estudio, en el que la administración se realizó cada veinticuatro horas, y en el que podríamos haber infravalorado el grado de exposición, comparado éste con el que se hubiera alcanzado tras un año de exposición con la posología habitual del $\text{Al}(\text{OH})_3$ cuando éste se utiliza como antiácido. Para intentar obviar este efecto, la dosis administrada fue la proporcional en uso clínico habitual, incrementada al administrarse en dosis única.

El hueso, como era de esperar, se mostró como un tejido especialmente proclive al acúmulo de aluminio. La exposición oral provocó un incremento de nueve veces la concentración de aluminio con respecto al control, encontrándose en límites de significación estadística con métodos paramétricos ($p < 0,08$); ante la dificultad de aumentar en tres casos para alcanzar la significación se realizó el test de Mann-Whitney, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,01$). Una exposición masiva como la del grupo con administración parenteral produjo, a pesar de la función renal normal, un acúmulo óseo de alu-

minio muy por encima del dintel patológico establecido en humanos²³, indicando una participación importante del hueso en la distribución corporal y en el control homeostático del aluminio. Otro órgano con gran capacidad para almacenar aluminio fue el hígado, en el que se objetivaron incrementos significativos en el grupo de exposición parenteral (cien veces superiores a los niveles del grupo control). En el grupo de exposición oral, el incremento de aluminio fue diez veces superior, sin llegar a ser significativo, manteniendo la proporcionalidad tisular esperada.

Los valores de aluminio encontrados en tejido miocárdico reflejan diferencias significativas únicamente en el grupo de exposición masiva parenteral, y aunque su concentración es escasa (2,52 µg/g), supone un incremento de cuatro veces, similar al encontrado en pacientes en hemodiálisis respecto a un grupo control¹⁹.

A nivel del sistema nervioso central, como se observa en la tabla I, los incrementos de las ratas con exposición intraperitoneal fueron 3,5 veces superiores a los de las ratas controles; por el contrario, en aquellas con exposición oral, sus niveles, aunque superiores a los del grupo control, sólo alcanzaron significación estadística con test no paramétricos. La realización del test de campo abierto permitió observar cambios en el comportamiento en el grupo expuesto por vía oral del mismo orden de magnitud del observado en el grupo expuesto por vía intraperitoneal, a pesar de que este último tenía unas concentraciones de aluminio en suero y cerebro superiores (estadísticamente no diferentes), indicando una escasa correlación entre concentración de aluminio cerebral y función (tabla III). Este hecho no es sorprendente, dado que es conocida la escasa correlación existente entre aluminio cerebral y encefalopatía dialítica, en la que se han referido valores de aluminio cerebral desde cifras tisulares similares a las esperadas en población normal hasta diez veces el valor de los controles²⁴. A pesar de que el grupo de ratas control no recibió placebo, éstas fueron manipuladas de forma similar, ya que participaron como controles en diversos estudios a lo largo del año de exposición.

En resumen, este estudio demuestra que la exposición crónica al aluminio conlleva un riesgo de intoxicación por dicho elemento que se consigue aun en presencia de función renal normal. La determinación del aluminio urinario en veinticuatro horas, además de un parámetro útil para valorar la absorción de aluminio^{25, 26}, puede ser orientativa respecto al grado de acumulación tisular del mismo. El riesgo de intoxicación sería superior si dicha exposición supone una mayor biodisponibilidad del elemento, función esta última dependiente del compuesto químico, vía de administración, posología y características peculiares de cada sujeto que puedan o no favorecer su absorción. La cinética de distribución corporal del aluminio seguiría un modelo pluricompartimental; su acción patógena sería función de la afinidad de cada tejido para permitir su acúmulo, de su distribución a nivel

celular y de la acción específica que el aluminio ejerza en cada tejido.

Estos resultados experimentales son lo suficientemente elocuentes como para plantearse la necesidad de estudiar en un futuro inmediato el papel que pueda jugar en patología humana la exposición crónica al aluminio en la génesis de alteraciones óseas y cerebrales, consideradas hasta la fecha secundarias al proceso de involución senil.

Agradecimientos

- Este trabajo ha recibido apoyo del FISs 88/1613 y de la FICYT 1987-1989.
- A Mercedes Serrano y M.^a Luisa Rodríguez por su colaboración en la ejecución de este proyecto.

Bibliografía

1. Spofforth J: Case of aluminium poisoning. *Lancet*, 1:1301, 1921.
2. Alfrey AC, Legendre GR y Kaheney WD: The dialysis encephalopathy syndrome. Posible aluminium intoxication. *N Engl J Med*, 294:184-188, 1976.
3. Ward MK, Feest TG, Ellis HA y cols.: Osteomalacia dialysis osteodystrophy: evidence for a water borne aetiological agent, probably aluminium. *Lancet*, 1:841-845, 1978.
4. De Francisco ALM, Palacios S, Val F y cols.: Osteomalacia pura en hemodiálisis resistente a 1,25(OH)₂D₃. *Nefrología*, 3:101-107, 1983.
5. Wills M y Savory J: Aluminium poisoning: Dialysis encephalopathy osteomalacia and anaemia. *Lancet*, 2:29-34, 1983.
6. Cannata JB: Aluminium-induced toxicity in dialysis patients. Role of water and other sources on its pathogenesis. En Lopot F (ed.). *Water treatment monograph*. EDTNA-ERCA, Pitman, London, 3:50-64, 1988.
7. Kaye M: Oral aluminium toxicity in a non-dialyzed patient with renal failure. *Clinical Nephrol*, 20 (4):208-211, 1983.
8. Ott SM: Aluminium Accumulation in individuals with Normal Renal Function. *Am J Kidney Dis*, VI (5):297-301, 1985.
9. Olaizola I, Aguado S, Rodrigo L y Cannata JB: Absorción de hidróxido de aluminio en pacientes. Resultados preliminares sobre el efecto del pH y de la hiperalbuminemia. *Nefrología*, IX (1):103-104, 1989.
10. Silverman P: *Animal behaviour in the laboratory*. Ed. by Chapman and Hall, London. Chap 7:235-238, 1978.
11. Hernández Tristán: *Conducta general y testosterona en la rata: un modelo de comportamiento basado en esta relación*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid, 1984.
12. Lee Emine HY, Tang YP y Chai CY: Stress and corticotropin-releasing factor potentiate center region of mice in an open field. *Psychopharm*, 93:320-323, 1987.
13. Cannata JB, Reguera Alvarez MR, Fernández Soto I, Cuesta MV, Noval Vallina A y Sanz Medel A: Consideraciones metodológicas sobre recogida y almacenamiento de muestras para determinación de aluminio. *Nefrología*, VI (3):35-39, 1986.
14. Sanz-Medel A, Rodríguez Roza R, González Alonso R, Noval Vallina A y Cannata JB: Atomic Spectrometric Methods (Atomic Absorption and Inductively Coupled Plasma Atomic Emission) for the Determination of Aluminium at the Parts per Billion in Biological Fluids. *J Anal At Spectrom*, 2:177-184, 1987.
15. Klein GL, Alfrey AC y Miller NL: Aluminium loading during parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr*, 35:1425-1429, 1982.

16. Andress D, Fenselfeld AJ, Voigts A y Llach F: Parathyroid hormone response to hypocalcemia in haemodialysis patients. *Kidney Int*, 24:364-370, 1983.
17. O'Hare JA y Murnaghan DJ: Reversal of aluminium-induced haemodialysis anaemia by a low-aluminium dialysate. *N Engl J Med*, 306:654-656, 1982.
18. Díaz López JB, Cannata JB y D'Haese P: Parathyroid hormone release in aluminium loaded rats with and without renal failure. *Proc of Trace Element in Human Health and Disease*. World Health Organization, 20:21-25, 1987.
19. De Broe ME, Van de Vyver FL, Bekaert AB y cols.: Correlation of serum aluminium values and tissue aluminium concentration. *Contr Nephrol*, 33:37-38, 1984.
20. Smeyers-Verbeke J y Verbeelen D: Determination of aluminium in bone by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem*, 31: 1172-1174, 1985.
21. De Broe ME, Van de Vyver FL, Silva FJ y cols.: Measuring aluminium in serum and tissues: overview and perspectives. *Nefrología*, 6 (supl.):41-46, 1986.
22. Gupta SK, Waters DH y Gwilt PR: Absorption and disposition of aluminium in the rat. *J Pharm Sci*, 75:586-589, 1986.
23. Visser WJ y Van de Vyver FL: Aluminium-induced osteomalacia in severe chronic renal failure. *Clin Nephrol*, 24 (Suppl. 1):s30, 1987.
24. Sweeney VP, Perry TL, Price JD y cols.: Brain gamma-aminobutyric deficiency in dialysis encephalopathy. *Neurology*, 35:180-184, 1985.
25. Weberg R y Berstard A: Gastrointestinal absorption of aluminium from single doses of aluminium containing antacids in man. *Eur J Clin Invest*, 16:428-432, 1986.
26. Olaizola I, Fernández Menéndez MJ, Fernández Martín JL, Vizoso Piñeiro FJ, Roza Suárez M y Cannata JB: Efecto de la insuficiencia renal crónica de la intoxicación aluminica y de la edad sobre la absorción gastrointestinal del hidróxido de aluminio. *Nefrología*, 9:65-71, 1989.