

**Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario**

TESIS DOCTORAL

**INVESTIGACIÓN DE LA INTERACCIÓN
CALCIO-FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL
DE RATA Y SU RELACIÓN
CON LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO**

Lucas Ricardo Martín Brun

Director: Dr. Alfredo Rigalli

2009



Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral

www.biologiaosea.com.ar

A Jazmín, quien ilumina mi vida.

A Lore, quien llena mi corazón.

A mi mamá, hermano y abuela, por su apoyo constante.

ÍNDICE

1	RESULTADOS PUBLICADOS	6
2	RESUMEN	9
3	INTRODUCCIÓN	11
3.1	MARCO HISTÓRICO	11
3.2	FOSFATASA ALCALINA.....	13
3.2.1	<i>Propiedades.....</i>	15
3.2.2	<i>Función.....</i>	16
3.2.3	<i>Alteraciones séricas de la fosfatasa alcalina.....</i>	17
3.2.4	<i>Fosfatasa alcalina intestinal (FAi).....</i>	18
3.2.5	<i>Fosfatasa alcalina intestinal y calcio.....</i>	19
3.3	CALCIO	20
3.3.1	<i>Generalidades.....</i>	20
3.3.2	<i>Metabolismo del calcio.....</i>	20
3.3.2.1	<i>Parathormona.....</i>	21
3.3.2.2	<i>Vitamina D.....</i>	22
3.3.3	<i>Regulación renal de calcio.....</i>	24
3.3.4	<i>Absorción intestinal de calcio.....</i>	25
3.3.4.1	<i>Transporte paracelular.....</i>	26
3.3.4.2	<i>Transporte transcelular.....</i>	26
3.3.4.3	<i>Transporte vesicular.....</i>	31
3.3.5	<i>Factores que aumentan la absorción de calcio.....</i>	31
3.3.6	<i>Factores que disminuyen la absorción de calcio.....</i>	32
3.3.7	<i>Calcio fecal endógeno.....</i>	33
4	OBJETIVOS.....	35
4.1	OBJETIVO GENERAL	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5	MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1	ANIMALES	36
5.2	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DE CALCIO A LA FAi	36
5.3	DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INHIBICIÓN DE FAi POR EL Ca ²⁺	37
5.4	ESTUDIO DE AGREGABILIDAD DE FAi EN PRESENCIA DE Ca ²⁺	37
5.4.1	<i>Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de ⁴⁵Ca²⁺.....</i>	37
5.4.2	<i>Por polarización de la fluorescencia.....</i>	38
5.4.3	<i>Por cromatografía de exclusión molecular.....</i>	38
5.4.4	<i>Por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot.....</i>	38
5.4.5	<i>Por electroforesis bidimensional.....</i>	38
5.5	ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN Y REVERSIBILIDAD DE LA UNIÓN Ca ²⁺ -FAi	39
5.5.1	<i>Tratamiento de la FAi con EGTA después de la exposición al Ca²⁺.....</i>	39
5.5.2	<i>Tratamiento de la FAi con EGTA antes de la exposición al Ca²⁺.....</i>	39
5.6	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CALCIO-FAi IN VIVO Y SU RELACIÓN CON LA ABSORCIÓN DE CALCIO	40
5.6.1	<i>Por intestino aislado in situ.....</i>	40
5.6.2	<i>Por sacos duodenales evertidos.....</i>	41
5.7	PURIFICACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL	42
5.8	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	43
5.9	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	43

5.10	PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL DE RATA	44
5.11	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA	45
5.11.1	<i>En solución</i>	45
5.11.2	<i>En geles de poliacrilamida</i>	45
5.11.3	<i>En membrana de nitrocelulosa</i>	46
5.11.4	<i>Sobre preparados histológicos en la membrana del enterocito</i>	46
5.12	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FOSFATASA ALCALINA	46
5.12.1	<i>Dot blot</i>	47
5.12.2	<i>Western blot</i>	47
5.12.3	<i>Inmunohistoquímica</i>	47
5.13	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....	47
5.14	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	48
5.14.1	<i>Primera Dimensión: Isoelectroenfoque</i>	48
5.14.2	<i>Segunda Dimensión: Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida SDS</i>	49
5.15	WESTER BLOT	49
5.16	INTESTINO AISLADO IN SITU	50
5.17	SACOS DUODENALES EVERTIDOS	51
5.18	DETERMINACIÓN DE Ca ²⁺	51
5.19	DETERMINACIÓN DEL pH.....	51
5.20	DETERMINACIÓN DE FOSFATO	52
5.21	DETERMINACIÓN DE Ca ²⁺ RADIOACTIVO	52
5.22	PREPARACIÓN DE MUESTRAS HISTOLÓGICAS.....	52
5.22.1	<i>Obtención del espécimen</i>	52
5.22.2	<i>Inclusión en parafina</i>	52
5.22.3	<i>Preparación del bloque</i>	52
5.22.4	<i>Cortes</i>	52
5.22.5	<i>Coloración</i>	53
5.23	HISTOQUÍMICA	53
5.24	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	53
5.25	ANÁLISIS DE IMÁGENES DIGITALES.....	54
5.25.1	<i>Determinaciones sobre preparados histológicos</i>	54
5.25.2	<i>Determinaciones sobre membrana de nitrocelulosa</i>	55
5.26	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
6	RESULTADOS	57
6.1	PURIFICACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL	57
6.2	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DE CALCIO A LA FAi	58
6.3	DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INHIBICIÓN DE FAi POR EL Ca ²⁺	58
6.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAi EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺	59
6.5	ESTUDIO DE AGREGABILIDAD DE FAi EN PRESENCIA DE Ca ²⁺	59
6.5.1	<i>Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de ⁴⁵Ca²⁺</i>	59
6.5.2	<i>Por polarización de la fluorescencia</i>	60
6.5.3	<i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	60
6.5.4	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot</i>	61
6.5.5	<i>Electroforesis bidimensional</i>	62

6.6	ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN Y REVERSIBILIDAD DE LA UNIÓN Ca^{2+} -FAi	63
6.6.1	<i>Tratamiento de la FAi con EGTA antes de la exposición al Ca^{2+}</i>	63
6.6.2	<i>Tratamiento de la FAi con EGTA después de la exposición al Ca^{2+}</i>	64
6.7	EFFECTO DEL CALCIO SOBRE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA FAi <i>IN VIVO</i>	65
6.8	RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAi CON LA ABSORCIÓN DE CALCIO	69
6.8.1	<i>MODIFICACIONES DEL pH LUMINAL EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO</i>	69
6.8.2	<i>ABSORCIÓN DE CALCIO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO LUMINAL</i>	71
6.8.3	<i>MODIFICACIONES DEL pH Y ABSORCIÓN DE CALCIO EN PRESENCIA DE L- FENILALANINA, INHIBIDOR DE LA FAi</i>	72
6.8.4	<i>MODIFICACIONES DE FOSFATO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO LUMINAL</i>	73
7	APÉNDICE.....	75
7.1	ACTIVIDAD DE FAi EN SOLUCIÓN	75
7.2	CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} EN PRESENCIA DE EGTA76	
7.3	EFFECTO DE LA FAi Y EL Ca^{2+} SOBRE EL pH	81
7.4	ESTIMACIÓN DEL CALCIO QUE PRECIPITA COMO FOSFATO DE CALCIO	84
7.5	MODIFICACIONES DEL PATRÓN DE LIBERACIÓN DE FAi	87
8	DISCUSIÓN	89
8.1	FAi	89
8.2	FAi Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS	89
8.3	FAi Y CALCIO	90
8.4	Ca^{2+} Y MEMBRANA	93
8.5	FAi <i>IN VIVO</i>	94
9	CONCLUSIONES	97
10	ABREVIATURAS.....	98
11	AGRADECIMIENTOS.....	100
12	REFERENCIAS	101

1 RESULTADOS PUBLICADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han dado a lugar a:

Trabajos publicados

Brun LR, Traverso A, Rigalli A. Aggregation and inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase by high concentrations of calcium. Reversibility of the processes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24(3), 691-96. 2009.

Brun LR, Brance ML, Rigalli A, Puche RC. Effect of calcium on rat intestinal alkaline phosphatase activity and molecular aggregation. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 21(6), 757-63. 2006.

Trabajos presentados en congresos

Brun LR, Brance ML, de Candia LF, Traverso A, Rigalli A. Participación de la fosfatasa alcalina intestinal de rata en la regulación de la absorción de calcio. XXV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires, noviembre de 2008.

Brun LR, de Candia LF, Brance ML, Di Loreto V, Rigalli A. Efecto del calcio sobre la actividad y expresión de la fosfatasa alcalina intestinal. IX Congreso y XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, noviembre de 2007.

Brun LR, Traverso A, Rigalli A. Modificación del punto isoeléctrico de la fosfatasa alcalina intestinal de rata en presencia de calcio. XXIV Reunión Anual Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires, agosto de 2007.

Brun LR, Brance ML, de Candia LF, Traverso A, Rigalli A. Niveles de fosfatasa alcalina intestinal de rata en experimentos de sacos evertidos a diferentes concentraciones de calcio lumbinales. XXIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Rosario, octubre 2006.

Brance ML, Brun LR, De Candia LF, Rigalli A, Puche RC. Modificación de la actividad de la fosfatasa alcalina intestinal y su relación con la cinética de absorción de calcio en la rata. XXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, diciembre 2005.

Brun LR, Brance ML, Rigalli A, Puche RC. Unión del catión calcio a la fosfatasa alcalina intestinal de la rata. Modificación de la cinética enzimática y su estructura molecular. XXII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires, noviembre 2005.

Brance ML, Brun LR, Rigalli A, Puche RC. Efecto del calcio sobre la fosfatasa alcalina intestinal del borde en cepillo de la rata *in vivo*. XXII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires, noviembre 2005.

Abstract publicados

Brun LR, Brance ML, de Candia LF, Traverso A, Rigalli A. Rol of intestinal alkaline phosphatase on the mechanism of calcium (Ca) absorption. *Bone*, 43:S134, 2008.

Brun LR, Brance ML, de Candia LF, Traverso A, Rigalli A. Participación de la fosfatasa alcalina intestinal de rata en la regulación de la absorción de calcio. *Actualizaciones en Osteología*, 4(1):S97. 2008.

Brun LR, Traverso A, Rigalli A. Effect of calcium on isoelectric focusing (IEF) of rat intestinal alkaline phosphatase (IAP). *Bone*, 41(6):S6. 2007.

Brun LR, Brance ML, de Candia LF, Traverso A, Rigalli A. Rat intestinal alkaline phosphatase (IAP) levels at different intestinal calcium concentrations. Experiments with intestinal everted sacs. *Bone*, 40:S8. 2007

Brance ML, Brun LR, de Candia LF, Rigalli A, Puche RC. Intestinal alkaline phosphatase (IAP) activity and kinetic of intestinal calcium (Ca) absorption in rats. *Biocell*, 30(2):386. 2006.

Brun LR, Brance ML, Rigalli A, Puche RC. Kinetics and structural changes of intestinal alkaline phosphatase by calcium binding. *Bone*, 38(5):S5. 2006.

Brance ML, Brun LR, de Candia LF, Rigalli A, Puche RC. In vivo effect of calcium on brush border intestinal alkaline phosphatase in the rat. *Bone*, 38(5):S16. 2006.

Brun LR, Moreno H, Rigalli A, Puche RC. Different chemical forms of rat intestinal alkaline phosphatase (IAP). *Biocell*, 29(1):127. 2005.

Capítulos de libro

Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat. Año edición: 2009. 252 páginas. Editorial: CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL. USA. Editores: Alfredo Rigalli, Verónica Di Loreto. ISBN: 978-1-4200-9326-1.

- In situ isolation of the intestinal loop. María L Brance, Lucas R M Brun, Alfredo Rigalli. Páginas 95-97.
- Intestinal everted sacs. Lucas R M Brun, María L Brance, Lucas F de Candia, Alfredo Rigalli. Páginas 99-101.
- Polyclonal antibodies preparation. Laura I Pera, Lucas R M Brun, Alfredo Rigalli. Páginas 217-220.
- Histological procedures. María L Brance, Lucas R M Brun, Alfredo Rigalli. Páginas 221-227.

2 RESUMEN

El monofluorofosfato de sodio es utilizado con fines terapéuticos en pacientes con osteoporosis. Habitualmente dicha medicación es acompañada con la administración de sales de calcio (Ca^{2+}). Luego de una dosis oral de monofluorofosfato de sodio una fracción es absorbida en el estómago mientras que en la luz intestinal el remanente es absorbido como fluoruro luego de la hidrólisis por la fosfatasa alcalina intestinal (FAi). Experimentos previos demostraron que el Ca^{2+} en concentración 50 mM inhibe no competitivamente la FAi de rata. La FAi tiene máxima expresión en duodeno y si bien no tiene aún un rol definido a nivel intestinal es llamativo que: 1) Su expresión es regulada por la calcitriol al igual que las proteínas que participan en la absorción de Ca^{2+} . 2) La distribución del transportador TRPV6 tiene el mismo patrón que la FAi. 3) La FAi se expresa a nivel intestinal coincidiendo con el sitio de mayor absorción del catión. 4) La distribución de los dos mecanismos de transporte de Ca^{2+} (activo y pasivo) en intestino delgado sea similar a la distribución de las dos isoformas de FAi.

El objetivo de este proyecto de tesis fue estudiar la interacción entre el Ca^{2+} y la FAi y el efecto de dicha interacción sobre el proceso de absorción del catión.

Para cumplir con los objetivos se purificó FAi a partir del duodeno de ratas adultas y se produjo un anticuerpo por su inoculación a cobayos.

Con la FAi purificada se hallaron los parámetros de fijación de Ca^{2+} a la FAi. Los resultados hallados indican que el Ca^{2+} se une a la FAi siguiendo un modelo de "n" sitios independendientes e igual afinidad. La constante de afinidad fue $19.1 \pm 8.4 \text{ mM}^{-1}$ con 7.8 ± 4.4 sitio de unión.

El efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de FAi se investigó espectrofotométricamente (1) y por electroforesis (2). En ambos casos la actividad de FAi mostró un efecto bifásico dependiendo de la concentración de Ca^{2+} . A concentraciones de Ca^{2+} menores a 10 mM la actividad se incrementó linealmente, mientras que con concentraciones de Ca^{2+} mayores a 20 mM la relación fue inversa [(1) $r = 0.946$; $r = -0.703$; (2) $r = 0.721$; $r = -0.773$]

Se investigaron los cambios estructurales de la FAi purificada de rata producidos por incubación de la enzima con Ca^{2+} 50 mM por cromatografía de exclusión molecular y Western blot. Se detectaron dos fracciones de la enzima: 168 ± 6 kDa (con actividad enzimática) y 425 ± 45 kDa (sin actividad enzimática).

El punto isoeléctrico de la enzima resultó más alto en la presencia de Ca^{2+} (0 mM = 4.35 ± 0.02 ; 50 mM = 4.85 ± 0.06) , pero fue el mismo para la enzima y la forma agregada. El

tratamiento con EGTA después de la adición de Ca^{2+} no restauró la actividad enzimática, pero produjo desagregación de la enzima y aparición de sus monómeros, indicando que el Ca^{2+} podría ser requerido para la acción de la enzima o estar involucrado en la estabilidad de la estructura dimérica.

Empleando el modelo de intestino aislado *in situ* y determinación histoquímica se determinó el efecto de las diferentes concentraciones de Ca^{2+} *in vivo* sobre la actividad de la FAi. No se observó el efecto bisfásico hallado *in vitro*, sino se observó un aumento significativo de la actividad de la enzima en la membrana a medida que se incrementó la concentración de Ca^{2+} . Los resultados de expresión de FAi en la membrana no mostraron diferencias significativas entre los grupos afirmando que las diferencias de la actividad observadas por histoquímica no se deben a un cambio de expresión

Estos datos sumados a que la FAi modifica su expresión de acuerdo a los niveles de calcitriol hacen sospechar que podría actuar en el mecanismo de absorción de Ca^{2+} . La FAi hidroliza éster monofosfóricos generando fosfato y protones y existe evidencia de que la disminución del pH del lumen intestinal modificaría la actividad de los canales de Ca^{2+} TRPV6.

Se realizaron experimentos de sacos duodenales evertidos a fin de determinar el pH y la absorción de Ca^{2+} en función de diferentes concentraciones de Ca^{2+} luminal (1, 10, 50 y 100 mM). Se observó un descenso significativo del pH en solución mucosa de los grupos con 10, 50 y 100 mM. La fracción de absorción disminuyó a medida que se incrementó la concentración de Ca^{2+} , paralelamente al descenso de pH. Los experimentos indican que el fosfato generado por hidrólisis no sería el responsable de la disminución de la fracción de absorción. Finalmente cuando los experimentos de sacos evertidos duodenales fueron llevados a cabo en presencia de L-fenilalanina se observó un descenso de pH significativamente menor con un incremento en la fracción de absorción en todos los grupos experimentales.

Estos resultados fortalecerían la hipótesis que el pH regularía la entrada de Ca^{2+} por vía transcelular y la FAi sería sensora de las concentraciones de Ca^{2+} luminal e impediría el ingreso de cantidades tóxicas del catión al enterocito.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 MARCO HISTÓRICO

El monofluorofosfato de sodio ([MFP], CAS 10163-15-2) utilizado con fines terapéuticos en pacientes con osteoporosis [1,2,3], habitualmente es co-administrado con sales calcio (Ca^{2+}). El estudio de la asociación entre el MFP y el Ca^{2+} ha mostrado resultados contradictorios. Algunos trabajos hallaron disminución de la biodisponibilidad del MFP [4], otros no encontraron influencia del Ca^{2+} [5,6], mientras que algunos reportaron un aumento de la biodisponibilidad de flúor a partir del MFP [7,8].

Nuestro grupo demostró que, luego de una dosis oral de MFP, una fracción del mismo es absorbida en el estómago, mientras que en la luz intestinal el remanente [9] es absorbido como fluoruro luego de la hidrólisis por la fosfatasa alcalina intestinal [10]. En ausencia de Ca^{2+} la velocidad con que se hidroliza el MFP es superior a su tasa de absorción por lo que la absorción intestinal de MFP sin hidrolizar es despreciable [9].

Experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados en nuestro laboratorio demostraron que el Ca^{2+} en concentración 50 mM disminuye la actividad de la fosfatasa alcalina intestinal en la rata, produciendo una inhibición compatible con un modelo no competitivo (Ilustración 1) [11]. Esta inhibición produce una disminución en la velocidad de hidrólisis del MFP a fluoruro, aumentando de esta manera la vida media del MFP en la luz intestinal, favoreciendo su absorción intestinal y produciendo un aumento de su biodisponibilidad.

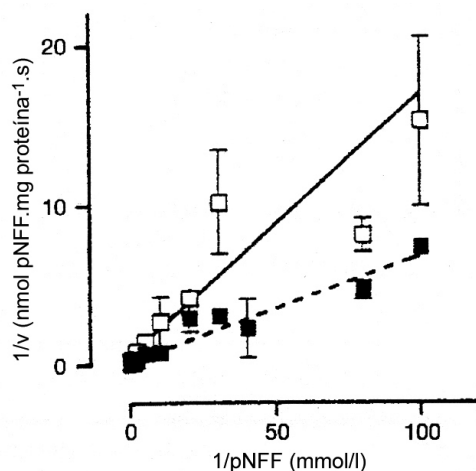


Ilustración 1. Representación de Lineweaver Burk para fosfatasa alcalina intestinal con Ca^{2+} (□) y sin Ca^{2+} (■), empleando p-nitrofenilfosfato como sustrato. Modificada de Beinlich A, 2003 [11].

Paralelamente se hallaron diferencias en la concentración plasmática de fluoruro y flúor total en ratas luego de administrar una dosis oral de MFP con y sin la co-administración de Ca^{2+} . El Ca^{2+} produjo una disminución del fluoruro plasmático sin modificaciones significativas en el flúor total, hecho compatible con una disminución de la hidrólisis a nivel gastrointestinal (Ilustración 2).

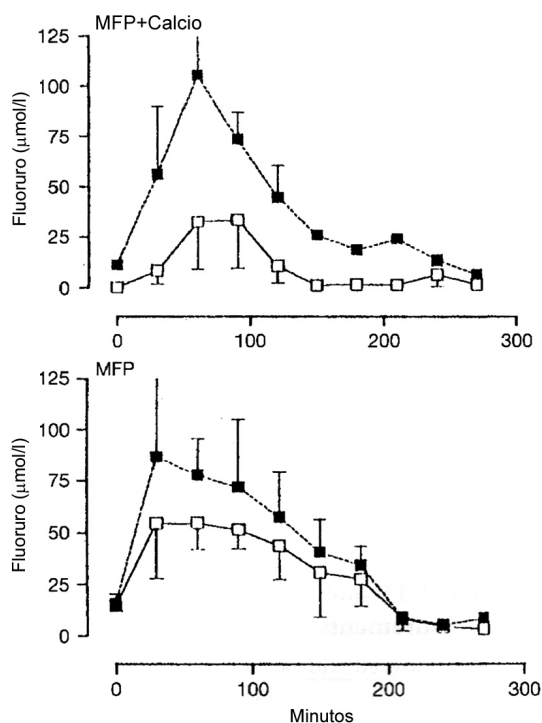


Ilustración 2. Concentración plasmática de fluoruro (□) y flúor total (■) en ratas luego de una dosis oral de 80 μmoles de MFP, conjuntamente con 50 μmoles de calcio (panel superior) y sin calcio (panel inferior). Modificada de Beinlich A, 2003 [11].

Experimentos realizados con intestino aislado *in situ* demostraron que el Ca^{2+} produce disminución de la formación de flúor a partir del MFP, con un patrón similar al producido por el agregado de L-fenilalanina, inhibidor de la fosfatasa alcalina intestinal (Ilustración 3).

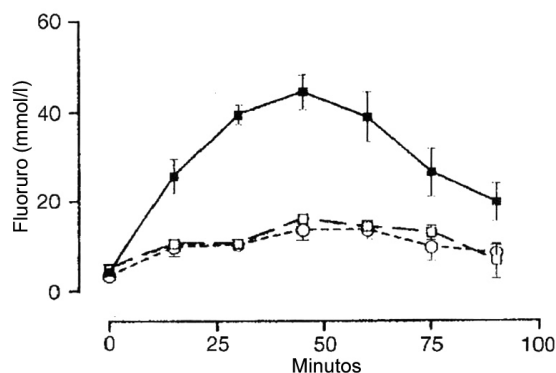


Ilustración 3. Concentración de fluoruro en la luz intestinal (experimento de intestino aislado *in situ*) para diferentes soluciones de llenado: (■) MFP 80 mM, (□) MFP 80 mM más calcio 50 mM y (○) MFP 80 mM más L-fenilalanina 10 mM. Modificada de Beinlich A, 2003 [11].

En la Tabla 1 se observan los valores de constante de velocidad de hidrólisis (K_h) y absorción de MFP (K_a) correspondientes a los experimentos para de intestino aislado *in situ* mencionados para la Ilustración 3.

Tabla 1. Efecto de la L-fenilalanina y el Ca^{2+} sobre la velocidad de hidrólisis y la absorción de MFP.

* $p < 0.05$ respecto del grupo control. Modificada de Beinlich A, 2003 [11].

	K_h (min^{-1})	K_a (min^{-1})
Controles	0.040±0.0009	0.006±0.0015
+ Ca^{2+} 50 mM	0.012±0.011*	0.042±0.0016*
+ L-fenilalanina 10 mM	0.011±0.011*	0.023±0.0015

3.2 FOSFATASA ALCALINA

La fosfatasa alcalina (FA, C 3.1.3.1) es una fosfomonoesterasa que hidroliza enlaces éster fosfórico de manera inespecífica a pH alcalino. Se localiza a nivel del glicocálix de las microvellosidades de los enterocitos, con predominio en las células ubicadas en la parte superior de las vellosidades. Su cantidad se incrementa a medida que los enterocitos ascienden desde la base de la vellosidad hacia el ápice, sector donde las células absortivas son más maduras [12]. La FAi se adhiere a la superficie celular a través de un anclaje donde interviene el fosfatidilinositol e interacciones hidrofóbicas. El glicocálix consiste principalmente en hidratos de carbono de la familia de los glicosaminoglicanos unidos a proteínas que conforman los proteoglicanos que se proyectan de la membrana apical de las células intestinales hacia la luz del intestino. También contribuye en su

constitución el ácido siálico unido a proteínas de membrana ¹. El glicocálix proporciona una superficie de protección con carga superficial negativa que contribuye en los procesos de digestión y absorción de proteínas e hidratos de carbono, pinocitosis, transporte activo, reconocimiento y adherencia celular e interacción célula-célula [13,14]. También es importante mencionar la presencia de mucus producido por las células caliciformes y por las glándulas de Brunner que vierten su secreción en las criptas y junto con el glicocálix constituyen una interfase entre la membrana plasmática y el contenido luminal [15,16].

Se encuentran varias isoenzimas como la fosfatasa alcalina ósea (FAo), hepática (FAh), renal (FAr), intestinal (FAi) y placentaria (FAp), entre las más importantes. A nivel óseo se expresa en la membrana del osteoblasto cuando estos se diferencian a partir de células progenitoras; en hígado se la encuentra en la membrana luminal de las células epiteliales de los canalículos biliares; en riñón en la membrana apical de los túbulos contorneados proximales principalmente y en menor medida en los distales; en intestino en la membrana apical de los enterocitos; y en placenta en el sinciotrofoblasto.

Las siguientes evidencias indican que las isoenzimas **hepática**, **renal** y **ósea** humanas son productos de un mismo gen por lo que se conocen como isoenzimas tejido no específicas (TNAP): a) muestran similar termoestabilidad y sensibilidad a inhibidores; b) la actividad de las 3 isoenzimas está deprimida en la hipofosfatasa autosómica recesiva; c) presentan reactividad cruzada inmunoquímica; d) muestran similar patrón electroforético luego de la digestión con neuraminidasa [17]. Estas similitudes indican que las diferencias halladas entre ellas se deberían a modificaciones post-traduccionales, principalmente a nivel del contenido de ácido siálico. El gen responsable se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (p34-p36) [18].

Por su parte, las isoenzimas **intestinal** y **placentaria**, presentan una homología del 87%, comparten ciertos determinantes antigénicos, termoestabilidad y sensibilidad a inhibidores, pero presentan diferencias en la movilidad electroforética. Por ello se planteó que debían ser originadas en genes diferentes los cuales han sido identificados en el cromosoma 2 (q34-q37) [19].

En suero normal más del 90-95% es de origen hepático y óseo, existiendo un predominio de la primera, excepto en los jóvenes en crecimiento donde es mayor la isoenzima ósea y en el tercer trimestre de embarazo donde la isoenzima placentaria es la que adquiere

¹ A diferencia de las isoenzimas del tejido óseo, hepático y renal, la FAi no contiene residuos de ácido siálico demostrado por cambios en la movilidad electroforética por efecto de la incubación con neuraminidasa. Referencia 30: Kaplan MM. Gastroenterology. 1972

importancia. La contribución de la FAi a la actividad de la FA sérica total es poca, aun en condiciones patológicas [20,21].

3.2.1 Propiedades

Todas las isoenzimas tienen un pH óptimo próximo a 9.8, similar afinidad por los sustratos, y semejante coeficiente de sedimentación. Además todas son metaloproteínas dependientes de zinc (Zn^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) [22,23,24].

El aminoácido L-fenilalanina es inhibidor no competitivo y estereoespecífico de las isoenzimas de fosfatasa alcalina de manera diferencial. Estudios realizados empleando homogenados de tejido hepático, óseo e intestinal demostraron que la isoenzima intestinal es la más afectada por este inhibidor (actividad remanente: FAi 5%, FAo 74.5%, FAh 74.5%) [25,26,27]. Resultados similares se han obtenido con el aminoácido L-triptófano, el cual en concentración 3 mM produjo aproximadamente un 70% de inhibición de la FAi y FAp, mientras que logró solo un 25% de inhibición sobre la actividad de la FAo y FAh [28].

A diferencia de L-fenilalanina, el levamisole ^{II} (5-20 mM) o su análogo el R8231 ^{III}, el L-p-bromotetramisol ^{IV} (0.10-0.27 mM) y la L-homoarginina (8 mM), actúan inhibiendo predominantemente las isoenzimas ósea, hepática y renal. Con el primero la actividad remanente de las mismas ronda, según la concentración utilizada, entre 0.7 y 2%. Por otra parte, las isoenzimas intestinal y placentaria presentan una actividad remanente entre 47 y 75%. El L-p-bromotetramisol muestra 3-10% de actividad remanente para las isoenzimas ósea, renal y hepática, con un 82-90% para las isoenzimas intestinal y placentaria [29,30,31,32]. Con L-homoarginina hallaron un 80% de inhibición de las isoenzimas ósea y hepática y menos del 10% de las isoenzimas intestinal y placentaria [33].

Las isoenzimas ósea y hepática son relativamente inestables a la temperatura (15 min 56°C) y a la desnaturalización por urea (18 min, 3M) [34].

Empleando Sephadex[®] G200 se determinó el peso molecular de las isoenzimas hepática (225 kDa), intestinal (190k Da), ósea (180 kDa) y renal (170 kDa). Estas diferencias son atribuidas al contenido de carbohidratos (fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetil glucosamina). A diferencia de la isoenzima intestinal, las del tejido óseo, hepático y renal contienen residuos de ácido siálico demostrado por cambios en la movilidad electroforética por efecto de la incubación con neuraminidasa [35].

^{II} Clorhidrato de [(-)-2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo(2,1-β)thiazol]

^{III} Oxalato de [(+/-)-6(m-bromofenil)-5,6-dihydroimidazo(2,1-β)thiazol]

3.2.2 Función

El rol fisiológico de la fosfatasa alcalina es parcialmente conocido. Su localización sugiere un rol en el movimiento de moléculas a través de las membranas.

Algunas investigaciones sugieren que la **isoenzima ósea** tendría funciones en el proceso de mineralización. La mineralización tanto del cartílago como del hueso requiere la presencia de vesículas en la matriz que son el sitio de acumulación de Ca^{2+} y fosfato (Pi). La fosfatasa alcalina crea un ambiente favorable para la deposición de este material y la formación del núcleo del cristal de hidroxapatita (HA). Luego de alcanzar los cristales cierto tamaño, se rompería la membrana de las vesículas y se liberarían los cristales de HA a la matriz. Luego, la matriz extracelular contiene suficiente Ca^{2+} y Pi, para mantener el proceso de nucleación y propagar la mineralización. El mecanismo de ensamble del mineral aún no se conoce, pero hay evidencias que participarían la anexina (Anx) y la fosfatasa alcalina. De los 12 miembros de la familia de las anexinas, las AnxA2, AnxA5 y AnxA6 se identificaron en las vesículas de la matriz. Se asocian a ambos lados de la membrana por lo que se sospecha que estarían involucradas en el transporte de Ca^{2+} al interior de las vesículas. También interactúan con la matriz extracelular dado que AnxA2 y la AnxA6 se fijan al condroitín sulfato y AnxA5 fija colágeno tipo II.

La FAo, marcadora de actividad osteoblástica, se localiza también en las vesículas de la matriz. En casos de hipofosfatasa se detectan defectos en la mineralización ósea así como ratones con deficiencia en el gen de TNAP presentan un cuadro similar a la hipofosfatasa [36]. Se propone que la FAo participa en el proceso de mineralización proveyendo Pi por hidrólisis de sustratos ya que en cultivos celulares, la suplementación de β -glicerofosfato como fuente externa induce osteogénesis y deposición de HA. El levamisol, inhibidor de fosfatasa alcalina, previene esta inducción por β -glicerofosfato. También hidrolizaría el pirofosfato inorgánico (PPi) y de esta forma estimularía la formación de HA [37,38].

Varios trabajos sugieren una participación de la **isoenzima intestinal** en el transporte de nutrientes.

La administración de vitamina D a pollos raquíuticos produce un incremento en 2-3 veces de la actividad de FAi y esto se incrementa paralelamente al transporte de Ca^{2+} [39].

Se demostró que la alimentación con aceite de pescado por sonda orogástrica incrementó un 94% la actividad de la FA en plasma [40]. En ratones con *knock-out* del gen de FAi alimentados por 6-8 meses con una dieta con alto contenido graso se observó mayor absorción de grasa, aumento de triglicéridos en plasma y ganancia de peso

^{IV} Etano dioato de [(-)-6-(4-bromofenil)-2,3,5,6-tetrahidroimidazol[2,1- β]tiazol]

acelerada respecto de los animales controles. Estos mismos resultados no se observaron cuando los animales fueron alimentados con dieta normal [41].

Respecto a la función de la **isoenzima hepática**, se la relaciona al transporte de colina a través de la membrana canalicular de los hepatocitos y en la superficie luminal de las células epiteliales biliares [42].

Las FA tejido no específica y de intestino de ratón están codificadas por los genes *Akp2* y *Akp3* respectivamente. No se observaron anomalías metabólicas severas en ratones con disrupción del gen *Akp3*, mientras que ratones *Akp2*-null exhibieron una severa forma de hipofosfatasa. El ratón *Akp3*^{-/-} presenta una ganancia de peso acelerada y aumento de los triglicéridos en plasma a las 7 horas, indicando la participación de la enzima en el proceso de absorción de grasa [36,41,43].

3.2.3 Alteraciones séricas de la fosfatasa alcalina

La actividad de FA se encuentra muy elevada en enfermedades hepáticas, pancreatitis, neoplasias hepáticas o pancreáticas debido principalmente al incremento de la isoenzima hepática, ya que se encuentra alterada su síntesis o su eliminación biliar.

Los incrementos de la actividad plasmática de FA a expensas de la isoenzima ósea son normales en los estados de crecimiento y reparación de fracturas así como en patologías como hiperparatiroidismo, osteomalacia, osteomielitis, y neoplasias óseas [42].

En seres humanos la actividad plasmática de FA varía según el grupo sanguíneo. Los enterocitos de pacientes grupo A fijan ávidamente a la isoenzima intestinal, por ello una fracción muy pequeña de la actividad plasmática de FA es debido a dicha isoenzima. Mientras que los enterocitos de pacientes grupo B o O fijan menos a la isoenzima intestinal teniendo esta isoenzima más importancia en la actividad plasmática total de FA. Normalmente menos del 10% del valor de actividad de FA en plasma es derivada de la isoenzima intestinal [42,44].

Algunas isoenzimas de FA están relacionadas con neoplasias. Una variante de la isoenzima placentaria llamada *Regan* se incrementa en neoplasias de pulmón, tracto gastrointestinal, ovario y útero. También se describe una variante denominada *Nagao* en seminomas y una conocida como *Kasahara* que se incrementa en algunos hepatomas [35,42].

Descensos en la actividad de FA plasmática son de valor en el diagnóstico de hipofosfatasa, enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una extrema disminución de la actividad de FA tejido no específica causada por una mutación del gen

que codifica estas isoenzimas. Esta deficiencia resulta en una marcada disminución de la mineralización ósea que puede ser fatal en neonatos e infantes [37].

3.2.4 Fosfatasa alcalina intestinal (FAi)

La FAi es una fosfomonoesterasa del ribete en cepillo del enterocito. Presenta un pH óptimo de 9.45 y contiene 15-20% de carbohidratos: fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetil glucosamina [45]. Es una glicoproteína dimérica de subunidades idénticas que requiere 4 átomos de Zn^{2+} por mol de dímero.

Su peso molecular es de 157-160 kDa determinado por filtración en gel y centrifugación en gradiente de densidad. El tratamiento de la FAi nativa con clorhidrato de guanidina 6 M o con un buffer a pH 3, produce la separación en dos subunidades idénticas de pesos moleculares de 78 y 70 kDa respectivamente. La FAi, como otras enzimas intestinales, es resistente al tratamiento con neuraminidasa [46].

Su contribución a la actividad de la FA total es menor al 10%, aun en condiciones patológicas de aumento de esta isoenzima [21].

Presenta su máxima expresión a nivel del duodeno, con disminución gradual a lo largo de todo el intestino. La actividad de FAi es más elevada en la punta de la vellosidad en comparación con las criptas, siendo la actividad de la enzima un marcador de madurez de los enterocitos [47,48]. Estudios de expresión entre sexos no han mostrado diferencias [49]. Experimentos realizados en pollos con dieta con bajo contenido de Ca^{2+} , demostraron a los 10 días un incremento de calcitriol y un aumento adaptativo de la absorción de Ca^{2+} . De los parámetros estudiados del transporte transcelular de Ca^{2+} se hallaron aumentados la bomba de Ca^{2+} y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Paralelamente la FAi también aumentó su expresión confirmándose su regulación por el calcitriol [48].

La enzima es secretada tanto hacia la luz intestinal como hacia el plasma [50], hallándose en estos sitios de manera soluble en lugar de anclada a membrana. La forma soluble, probablemente por descamación celular, se incrementa a lo largo del intestino [51,52].

La rata presenta dos isoformas de FAi con un 79% de identidad con diferencias marcadas a nivel del extremo carboxiterminal. Se ha demostrado la expresión de dos genes de la isoenzima intestinal que codificarían a FAi I de ubicación a lo largo de todo el intestino y FAi II de ubicación predominante en duodeno [53]. Esta última sería la involucrada en el transporte de lípidos a nivel duodenal [47].

En el desarrollo de esta tesis se mostrarán los efectos del Ca^{2+} sobre la estructura de la FAi. Para un mejor entendimiento de los resultados, se aclara que se empleará la

abreviatura FAi para hacer referencia a la enzima activa, dímero de subunidades idénticas. Cada una de las subunidades se denominará “monómero”, mientras que una especie de mayor peso molecular se denominará “agregado molecular” (Ilustración 4).

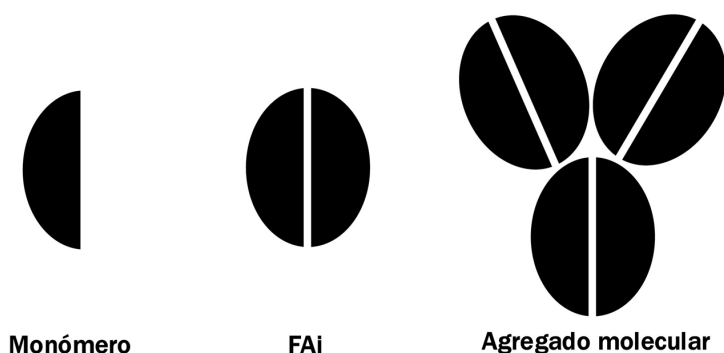


Ilustración 4. Representación esquemática de las diferentes formas de la fosfatasa alcalina intestinal.

3.2.5 Fosfatasa alcalina intestinal y calcio

Existe información sobre interacción FAi-Ca²⁺. Está descripto que a nivel intestinal existen dos isoenzimas, una Ca²⁺ y otra Mg²⁺ dependiente [54]. Hay evidencia de una FA de cartílago que liga 25 iones Ca²⁺ por mol de proteína, pero en este caso la enzima es de menor peso molecular que la intestinal [55].

Deliconstantinos et al. describieron un efecto inhibitorio rápido del Ca²⁺ (0-10 mM) sobre la FAi tanto en enzima soluble como en la ligada a membrana [56].

Finalmente y como ya fue mencionado, un trabajo de nuestro laboratorio, demostró que el Ca²⁺ en concentración 50 mM produce una inhibición no competitiva sobre la FAi [11].

En síntesis, si bien su rol no está completamente definido a nivel intestinal, su participación en el metabolismo mineral parecería incuestionable dado que:

- Su expresión es regulada por el calcitriol al igual que las proteínas que participan en la absorción de Ca²⁺ transcelular.
- La distribución del transportador de Ca²⁺ más importante a nivel intestinal (TRPV6) tiene el mismo patrón de distribución que la FAi con predominio en la punta de las vellosidades donde los enterocitos son más maduros respecto de los de la cripta.
- La FAi se expresa a nivel intestinal con un máximo en duodeno y una disminución gradual a lo largo de todo el intestino coincidiendo con el sitio de mayor absorción del catión.
- La distribución de los mecanismos de transporte de Ca²⁺ (transcelular y paracelular) en intestino coincide con la distribución de las dos isoformas de FAi (I y II).
- El Ca²⁺ produce una inhibición no competitiva sobre la FAi.

3.3 CALCIO

3.3.1 Generalidades

El Ca^{2+} es el catión más abundante en nuestro organismo y es esencial, no sólo en la formación de tejidos calcificados, sino también a nivel intracelular participando en la excitabilidad y permeabilidad de la membrana plasmática, secreción exócrina, regulación enzimática, neurotransmisión, contracción muscular, segundo mensajero en los procesos de transducción de señales, entre otros. Sin embargo sólo el 1% del Ca^{2+} total del organismo está presente en forma iónica en los fluidos biológicos y como es de esperar, su nivel se encuentra regulado por hormonas calciotrópicas como la parathormona (PTH) y el calcitriol que actúan principalmente sobre el hueso, riñón e intestino (Ilustración 5).

Las fuentes dietéticas y la ingestión de Ca^{2+} se han modificado durante la evolución del hombre. El hombre primitivo obtuvo Ca^{2+} de raíces, tubérculos, nueces y legumbres en cantidades que se supone excedían los 1500 mg/día y quizá se elevó al doble en el período recolector-cazador. El humano moderno consume, una cantidad de Ca^{2+} mucho menor, siendo actualmente el grupo de alimentos lácteos los que suministran la mayor cantidad de Ca^{2+} en la dieta. Dentro de los alimentos de origen animal algunos pescados como la sardina tienen muy alto contenido en Ca^{2+} siempre y cuando se lo consuma con el esqueleto. Las fuentes vegetales comprenden algunas verduras de hoja verde, legumbres, frutas secas, semillas y algas, pero su biodisponibilidad es baja [57].

Además del aporte de Ca^{2+} nutricional, existen algunas patologías que requieren la administración de Ca^{2+} como terapéutica. Tal es el caso de la osteoporosis, que si bien no se puede decir que esté relacionada únicamente con un aporte deficiente de Ca^{2+} , el hueso no puede alcanzar una adecuada estructura ósea y menos aún mantenerla. El aumento de la expectativa de vida y el envejecimiento de la población, exigen que centremos la atención en el metabolismo del Ca^{2+} .

3.3.2 Metabolismo del calcio

El 99% del Ca^{2+} corporal total, unos 1000 g aproximadamente, se encuentra en el mineral óseo formado los cristales de hidroxiapatita.

En el plasma el 50% se halla como Ca^{2+} iónico libre, un 10% ligado a aniones y el 40% restante ligado a proteínas, fundamentalmente albúmina. Dado que la fracción iónica es la biológicamente activa, es importante destacar posibles errores en la interpretación del Ca^{2+} plasmático total. Los cambios en el pH plasmático afectan su unión a proteínas plasmáticas. Las patologías que conducen a acidosis disminuyen su unión a proteínas

mientras que las que conllevan a alcalosis la aumentan. Otro factor a considerar son los cambios en la concentración de proteínas plasmáticas, por lo cual es necesario restar 0.8 mg/dl por cada gramo de albúmina que exceda los 4 g/dl y sumar la misma cantidad por cada gramo de albúmina por debajo de dicho nivel.

A nivel celular, la concentración del Ca^{2+} citosólico es del orden de 10^{-7} M, mientras que en el líquido extracelular es de 10^{-3} M.

Como se puede observar en la Ilustración 5 los órganos involucrados en el metabolismo del calcio son principalmente el riñón, el hueso y el intestino.

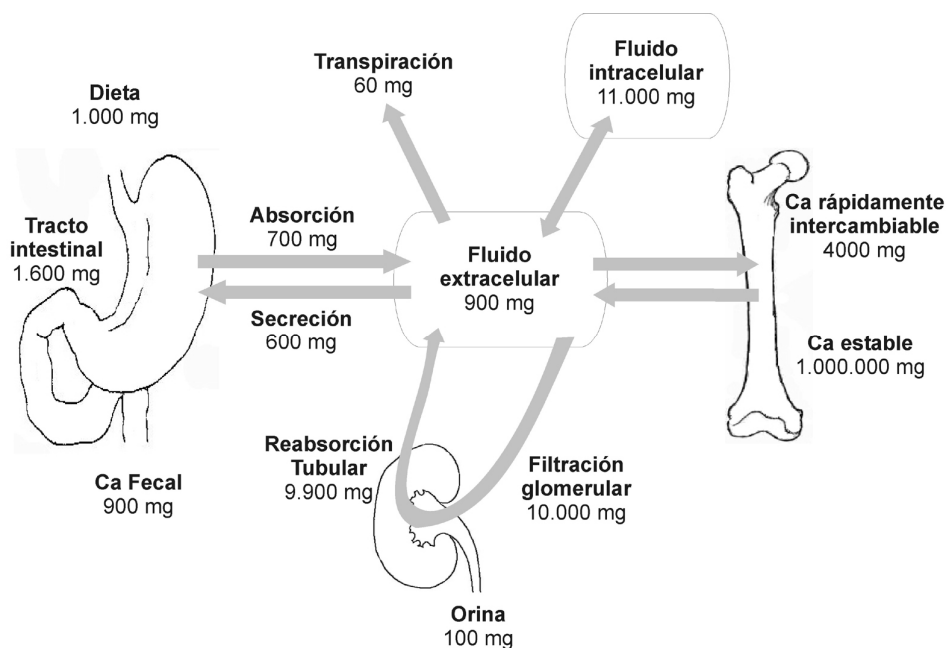


Ilustración 5. Esquema del metabolismo del calcio en un adulto con ingesta de 1 g de calcio por día. Modificada de Norman AW, 1979 [58].

3.3.2.1 Parathormona

La parathormona (PTH) es una proteína de 84 aminoácidos sintetizada por las glándulas paratiroides, ante disminuciones de la calcemia como principal estímulo. A nivel óseo, PTH estimula la liberación de RANKL por los osteoblastos, lo que induce proliferación de osteoclastos con el consecuente aumento de la resorción ósea. A nivel renal estimula una mayor reabsorción de Ca^{2+} por estimulación de receptores asociados a adenilil ciclasa en las células de los túbulos renales. Además estimula en el riñón la síntesis de la enzima 1- α -hidroxilasa lo cual conduce a un incremento de vitamina D activa y como consecuencia una mayor absorción de Ca^{2+} a nivel intestinal.

3.3.2.2 Vitamina D

La vitamina D puede obtenerse por ingesta de dos vitámeros: la vitamina D₂ o ergocalciferol y la vitamina D₃ o colecalciferol, de origen vegetal y animal, respectivamente. Los alimentos que la contienen no son habituales en nuestra dieta, por lo que se obtiene principalmente por síntesis endógena. Esta última consiste en la conversión del 7-dehidrocolesterol en vitamina D₃ en la piel por exposición a la luz ultravioleta. Posteriormente, es transportada por el plasma al hígado donde, por acción de la enzima 25-hidroxilasa, se convierte en calcidiol (25(OH)-vitamina D₃). Luego en riñón es transformado por la 1- α -hidroxilasa en calcitriol (1,25(OH)₂-vitamina D₃), forma hormonalmente activa [59] (Ilustración 6).

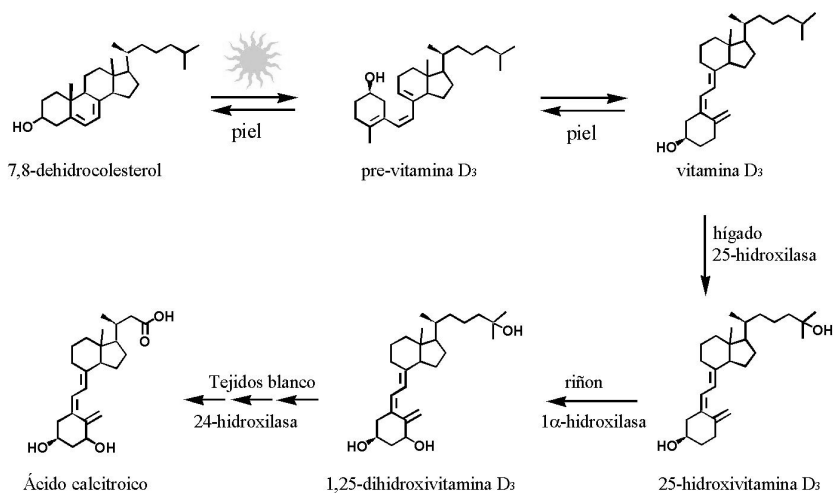


Ilustración 6. Síntesis, activación y catabolismo de la vitamina D. Modificada de Dusso AS, 2005 [59].

El calcitriol desempeña un rol central en la regulación de la homeostasis de Ca²⁺ (Ilustración 7), modulando los flujos de Ca²⁺ hacia y desde el medio extracelular. Actúa a través de un mecanismo genómico mediado por un receptor intracelular, típico de hormonas esteroideas y además produce efectos rápidos sobre el transporte de Ca²⁺ independientes de la acción génica.

A nivel intestinal el principal efecto del calcitriol es aumentar la absorción intestinal de Ca²⁺ induciendo la síntesis de las proteínas que participan en la vía transcelular. En células intestinales la hormona estimula, en forma rápida, las vías de segundos mensajeros intracelulares adenilil ciclasa/AMPc/PKA y fosfolipasa C/IP3/DAG/PKC que participan en la regulación del Ca²⁺ intracelular promoviendo el influjo de Ca²⁺ a través de

canales dependientes de voltaje y provocando la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. En estas células, el calcitriol también estimula vías de señalización intracelular ligadas a la fosforilación en tirosina que conducen a la activación de la tirosina quinasa citosólica c-Src la que participa en la fosforilación de la fosfolipasa $\text{C}\gamma$ y de las proteínas quinasas reguladas por mitógenos (MAP quinasas) ERK1 y ERK2, enzimas que regulan la proliferación celular. También estimula la absorción de fosfato, aunque significativas cantidades de fosfato son absorbidas aun en ausencia de calcitriol.

Los principales reguladores del nivel de calcitriol y sus metabolitos son: la PTH, el Ca^{2+} y el fosfato plasmático y el mismo calcitriol. La hipocalcemia incrementa los niveles de calcitriol por estimulación de la enzima 1- α -hidroxilasa, mientras que la hipercalcemia deprime la actividad de esta enzima e incrementa la actividad de la 24-hidroxilasa, enzima clave en la vía de inactivación y eliminación del calcitriol. La paratiroidectomía deprime severamente la inducción de la enzima 1- α -hidroxilasa mientras que la administración de PTH a animales intactos o paratiroidectomizados incrementa la producción de calcitriol. El efecto de PTH es directo sobre las células del túbulo proximal renal y es mediado por AMPc [59].

El calcitriol se une a su receptor intracelular (VDR, *vitamin D receptor*) el cual se halla en órganos relacionados al metabolismo mineral: intestino, hueso, riñón, glándulas paratiroides y en órganos no relacionados a este metabolismo como piel, músculo, páncreas, órganos reproductivos, sistema nervioso, inmune y hematopoyético. Luego de su unión al calcitriol se heterodimeriza con el receptor de ácido retinoico e interacciona con secuencias específicas del ADN, aumentando la expresión de los respectivos ARNm. Por otro lado el calcitriol se uniría a receptores de membrana que estimulan las vías de PKA y PKC, que fosforilan canales de Ca^{2+} voltaje dependiente del tipo L, produciendo el ingreso de Ca^{2+} al citoplasma.

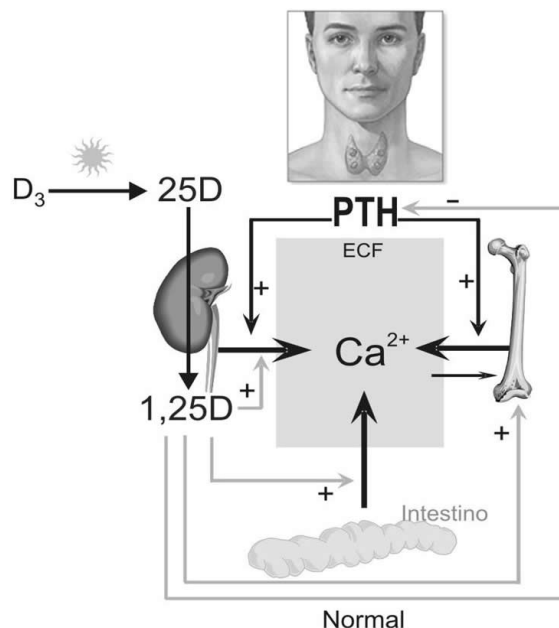


Ilustración 7. Principales factores involucrados en la regulación de la calcemia.

3.3.3 Regulación renal de calcio

El túbulo proximal renal es el sector de mayor importancia en la reabsorción renal de Ca^{2+} , reabsorbiendo 70% del total. El pasaje se realiza por difusión pasiva acompañando la reabsorción de Na^+ . El asa gruesa de Henle participa en el 20% de la reabsorción renal de Ca^{2+} y los túbulos contorneados distales y colectores sólo reabsorben 10% del Ca^{2+} filtrado por un mecanismo activo.

La regulación de Ca^{2+} a nivel renal depende de varios factores, la cantidad de Ca^{2+} presente en la dieta es uno de ellos. El Ca^{2+} fecal endógeno y el Ca^{2+} urinario son las únicas dos vías por las que se elimina el exceso de Ca^{2+} . En una dieta con exceso de Ca^{2+} , la excreción urinaria del catión estará aumentada de manera de mantener el balance Ca^{2+} en un valor cercano a cero.

La fisiología renal es el otro factor interviniente. El riñón actúa depurando Ca^{2+} y su función depende de parámetros hormonales, orgánicos y hemodinámicos. La PTH tiene receptores en riñón, que producen reabsorción renal de Ca^{2+} . La presencia de otras sustancias puede modificar la excreción renal de Ca^{2+} , como lo son los complejantes de Ca^{2+} como el oxalato, citrato y sulfato, los cuales forman con el Ca^{2+} compuestos poco disociados y/o insolubles que dificultan su reabsorción [60].

El funcionamiento del riñón es determinante en la excreción de Ca^{2+} ya que se reabsorben 98-99% del total del Ca^{2+} filtrado. Estos datos revelan que la regulación renal es altamente efectiva.

3.3.4 Absorción intestinal de calcio

La absorción de calcio varía fundamentalmente a lo largo del ciclo de la vida, siendo la etapa de lactancia el período de mayor absorción, con un porcentaje que ronda un 55-60%; en la adolescencia estos valores descienden a 35-40%, para estabilizarse en un 30% aproximadamente en la etapa adulta. A partir de los 50 años, la eficiencia de absorción declina casi 0.2% por año, con un porcentaje adicional del 2% en la menopausia [57].

Con respecto al consumo de Ca^{2+} , se observa una relación inversa con la eficiencia de la absorción; ésta disminuye a medida que la cantidad ingerida aumenta, siendo éste un mecanismo adaptativo de protección a las altas concentraciones de Ca^{2+} luminal. Está comprobado que superando 1 g/día de Ca^{2+} en la dieta la absorción normalmente no supera 500-600 mg/día (Ilustración 8) y se incrementa simultáneamente el Ca^{2+} fecal [58].

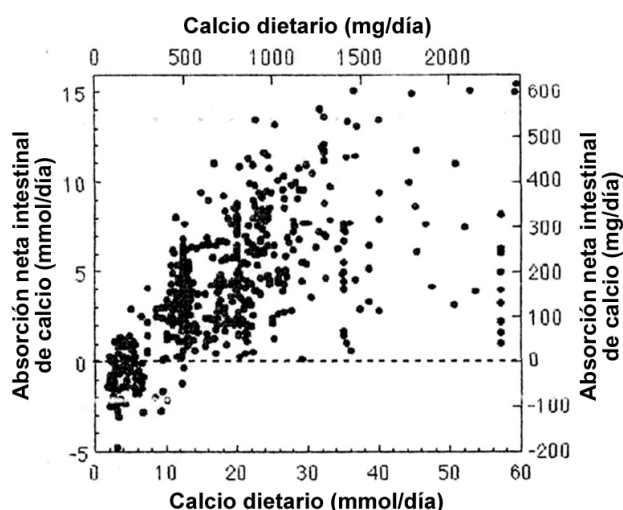


Ilustración 8. Absorción neta intestinal de calcio en función del calcio dietario.

Modificada de Favus MJ, 2006 [61].

El intestino presenta tres mecanismos de transporte de Ca^{2+} : transcelular, paracelular y vesicular [62,63,64], siendo los 2 primeros los que cuentan con mayores evidencias experimentales. A nivel del duodeno se puede demostrar la presencia de un mecanismo saturable y otro no saturable (Ilustración 9, izquierda), mientras que en el íleon solo existiría un mecanismo no saturable (Ilustración 9, derecha). La acción de cada mecanismo depende de la longitud de cada segmento del intestino y del tiempo de tránsito en los mismos. En general para los diferentes segmentos en la rata se puede considerar: duodeno 8 cm y 3 minutos, yeyuno: 36 cm y 45 minutos, íleon: 36 cm y 150 minutos.

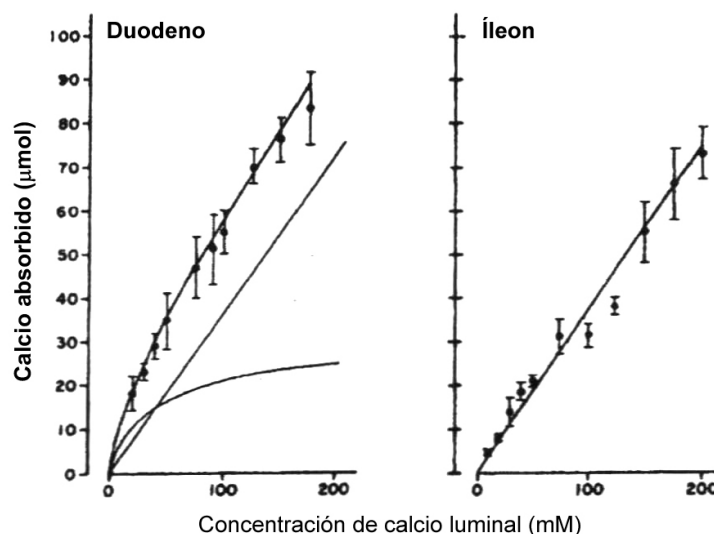


Ilustración 9. Transporte transcelular y paracelular. Modificado de Bronner F, 2003 [62].

3.3.4.1 Transporte paracelular

El mecanismo paracelular opera principalmente a altas concentraciones lumbales de Ca^{2+} , es no saturable y está presente a lo largo de todo el intestino delgado, predominando en el íleon por su longitud y tiempo de tránsito. Es un mecanismo de difusión simple a través de las uniones estrechas, siendo la cantidad transportada proporcional a la concentración luminal de Ca^{2+} e inversamente relacionado a la velocidad de tránsito del quimo.

Las uniones estrechas son un sector especializado de la membrana basolateral que se localiza próximo a la membrana apical y tiene propiedades de selectividad iónica y permeabilidad concentración dependiente. Las uniones estrechas están formadas principalmente por proteínas denominadas claudinas, familia de proteínas integrales de membrana con 4 dominios transmembrana y otras proteínas accesorias como las ocludina y espectrina [63]. El calcitriol produce en ratas disminución de claudina-3, reguladoras de las uniones estrechas intercelulares, y de esta manera regularía también el pasaje de Ca^{2+} a través del camino paracelular [65].

3.3.4.2 Transporte transcelular

El transporte transcelular opera a bajas concentraciones de Ca^{2+} , es saturable y dependiente de los niveles de calcitriol [66]. El mecanismo comprende el transporte a través de la membrana apical del enterocito por unión al canal epitelial de Ca^{2+} TRPV6 principalmente, el transporte intracelular por las calbindinas D9k (CBP_{9k}) y la extrusión en la membrana basolateral por la bomba Ca^{2+} -ATPasa (PMCA1b) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) (Ilustración 10) [62].

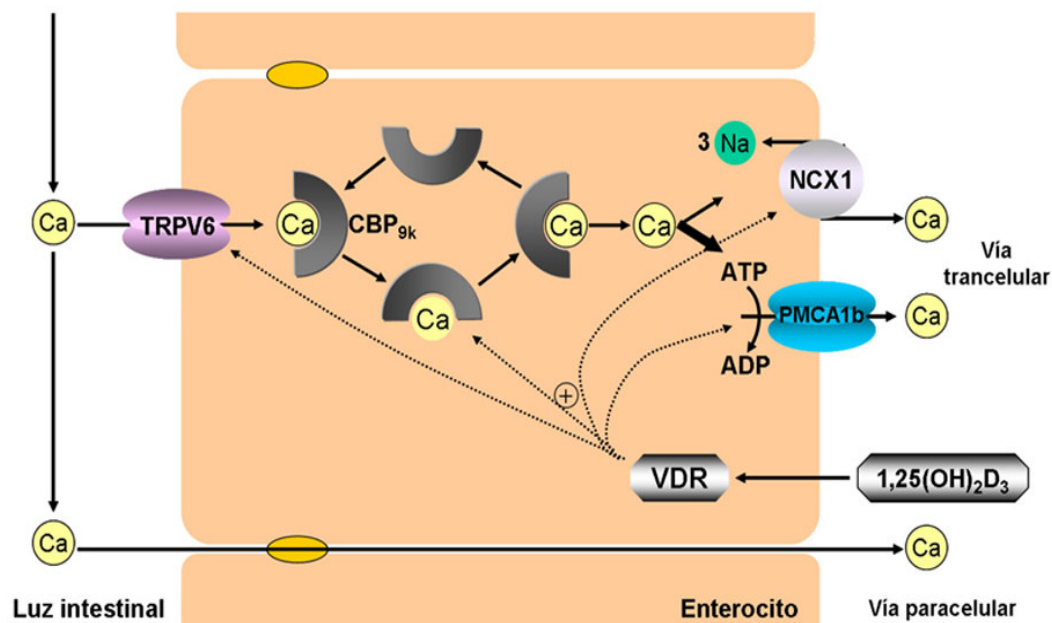


Ilustración 10. Transporte transcelular de calcio.

Ingreso de calcio al enterocito

La familia TRP (*Transient Receptor Potential*) son canales de Ca^{2+} de 6 dominios transmembrana de los que se conocen seis miembros: TRPV1 (VR1), TRPV2 (VRL-1), TRPV3, TRPV4 (VRL-2, OTRPC4), TRPV5 (CaT2, ECaC1) y TRPV6 (CaT1, ECaC2, CaT-L) [63,67].

TRPV5 y TRPV6 presentan una homología del 75.6% y comparando con los demás integrantes de la familia la homología es menor al 30%. También se diferencian en que TRPV5 y TRPV6 son transportadores selectivos de Ca^{2+} mientras que los demás son transportadores no selectivos.

TRPV6

El TRPV6 (CaT1 o ECaC2) es una proteína de aproximadamente 85 kDa de peso molecular, constituida por 725 aminoácidos en humanos y 727 en ratas y ratones. El gen se encuentra en el cromosoma 7q33-35 y contiene un extremo N-terminal citoplasmático, 6 dominios transmembrana, una región extracelular que actuaría como poro entre las regiones transmembrana 5-6 y un extremo C-terminal citoplasmático [63].

El glutamato 522 de la estructura que se ubica entre el 5º y 6º dominio transmembrana parece ser el involucrado en la regulación del canal para el Ca^{2+} [68]. El aspartato 542 parece estar involucrado en afinidad por el catión e histidina 557 en la fase rápida de inactivación del canal. Próximo al extremo C-terminal presenta un sitio de unión a

calmodulina (CaM), sitio que se ha hallado relacionado a la fase lenta de inactivación del canal. También presenta sitios de fosforilación por PKC que previenen la inactivación por CaM.

Se localiza en intestino, riñón y placenta, principales órganos involucrados en el transporte de Ca^{2+} . También se expresa en glándulas exócrinas como páncreas, estómago, glándula salival y mamaria. Su presencia en tejidos exócrinos se debería a que podrían cumplir un rol en la recaptación del Ca^{2+} necesario para la secreción vesicular. Además se ha encontrado sobreexpresión de TRPV6 en cánceres de próstata, mama, tiroides, ovario y colon [69,70].

En intestino y la placenta el TRPV6 es el canal de mayor importancia en el ratón, la rata y el humano. En el riñón, sin embargo, TRPV5 es el mayor transportador renal en el ratón y en la rata, pero en el humano la cantidad de TRPV6 es 10 veces mayor que TRPV5.

Las dietas con alto contenido de Ca^{2+} decrecen la expresión de TRPV6, TRPV5 y $\text{CBD}_{9\text{K}}$. En ratones *knock-out* de VDR los niveles de ARNm de TRPV6 se redujeron un 90%, así como también disminuyen los niveles de TRPV5 [71].

TRPV6 es inducido por el calcitriol más que la $\text{CBD}_{9\text{K}}$ en líneas celulares intestinales Caco-2, precediéndolo por varias horas.

Empleando muestras de mucosa duodenal humana, obtenida por endoscopia se determinó que tanto el calcitriol como el calcidiol incrementan significativamente el TRPV6 luego de 6 horas de incubación [72].

Cuando el Ca^{2+} ingresa por el canal, produce aumento intracelular de Ca^{2+} , el que se une a proteínas fijadoras de Ca^{2+} como la CaM. La unión a esta última determina que se una a dominios próximos al extremo C-terminal, produciendo la inhibición del canal. El Ca^{2+} difunde de CaM a $\text{CBD}_{9\text{K}}$, liberando la CaM y produciendo así la inhibición del canal.

Un reciente trabajo de Kutuzova et al, plantea que la falta del canal TRPV6, considerado hasta el momento crucial para la entrada del Ca^{2+} , no disminuyó la absorción intestinal del catión. Adicionalmente, la sobreexpresión del canal inducida por un análogo de la vitamina D, no produjo incremento de la absorción intestinal del catión [73]. Si bien estos resultados demuestran que el canal TRPV6 no sería esencial en el mecanismo de absorción intestinal de Ca^{2+} se requieren más trabajos que apoyen esta hipótesis.

TRPV5

El TRPV5 (CaT2 o ECaC1) es una proteína de 729 aminoácidos en humanos y 723 aminoácidos en ratas y ratones. El gen codificante se ubica en el cromosoma 7q35.

Contrariamente al TRPV6, predomina en riñón y está prácticamente ausente en intestino, cerebro, corazón, hígado, pulmón, músculo esquelético, bazo, timo, testículo y glándula suprarrenal.

Interviene en la captación apical de Ca^{2+} por células del túbulo contorneado distal y segmentos conectores del nefrón donde tiene lugar la reabsorción activa de Ca^{2+} a través de la vía transcelular.

TRPV5 y TRPV6

Estudios funcionales indican que serían las primeras moléculas diana en la regulación del pasaje transepitelial de Ca^{2+} tanto en intestino como en riñón [64].

El receptor TRPV5 es activado por concentraciones bajas de Ca^{2+} y pH alcalino, mientras que TRPV6 también es activado por concentraciones bajas de Ca^{2+} , pH alcalino y depleción de Ca^{2+} intracelular [69].

Ambos son permeables a Ba^{2+} y Sr^{2+} pero no a Mg^{2+} . TRPV5 y TRPV6 pueden ser bloqueados por cationes tri y divalentes como La^{3+} , Gd^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} . Son relativamente insensibles (inhibición menor al 10-15%) a bloqueadores de los canales activados por voltaje tipo-L como nifedipina, diltiazem y verapamil [69].

Debido a que altas concentraciones de Ca^{2+} son tóxicas para la célula existen mecanismos para evitarlas como la capacidad buffer de la calbindina y la inactivación de los canales de entrada.

TRPV6 tiene una fase de inactivación rápida (50 ms) y otra lenta (1 s). La fase lenta depende de CaM la cual presenta un sitio de unión al receptor en la región C-terminal. Un sitio proteín quinasa C existe en la unión CaM-TRPV6. La fosforilación de esta proteín quinasa previene la unión de la CaM. TRPV5 muestra sólo la fase lenta de inactivación. La necesidad del TRPV6 de tener una fase de inactivación rápida se debe a su localización intestinal en donde las variaciones de la cantidad de Ca^{2+} son importantes, mientras que en el riñón, donde predomina el receptor TRPV5, dichas variaciones son mínimas.

En ratas, las dietas deficientes en Ca^{2+} incrementan la expresión del ARNm de TRPV5 y TRPV6 tanto en adultos como en jóvenes, siendo el efecto menos evidente en adultos. La vitamina D de la dieta o el aporte exógeno de calcitriol duplica los niveles de ARNm de TRPV5, independientemente del Ca^{2+} dietario o la calcemia [65,74].

Difusión citosólica del calcio

Las calbindinas (CBP *calcium binding protein*) son proteínas ligadoras de Ca^{2+} pertenecientes a la superfamilia de la troponina C. Ellas incluyen la calbindina $\text{D}_{9\text{k}}$, calbindina $\text{D}_{28\text{k}}$, calretinina, parvalbúmina, S100. Son las encargadas de la difusión del Ca^{2+} hacia la membrana basal, donde se producirá la extrusión del mismo.

Calbindina $\text{D}_{28\text{k}}$ (CBP $_{28\text{k}}$): En rata, ratón y seres humanos es una proteína de 261 aminoácidos que presenta dominios para la unión de Ca^{2+} . En mamíferos se expresa en riñón, islotes de Langerhans y cerebro.

Calbindina $\text{D}_{9\text{k}}$ (CBP $_{9\text{k}}$): En ratón, rata y seres humanos tiene 79 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 9 kDa. El gen que lo codifica en seres humanos se halla ubicado en el cromosoma X. Se expresa en intestino, placenta, útero, riñón y páncreas, controlado por calcitriol y hormonas sexuales. Fue posteriormente demostrado que CBP $_{9\text{k}}$ se expresa sólo en enterocito diferenciado [75]. CBP $_{9\text{k}}$ transporta más del 90% del Ca^{2+} que atraviesa el enterocito, además de actuar como buffer de Ca^{2+} libre [76].

El transporte transcelular es función lineal del contenido de CBP $_{9\text{k}}$ y el paso limitante sería el contenido de TRPV6 en la membrana apical del enterocito.

Extrusión del calcio del enterocito

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Se conocen varios transportadores: NCX1 (*sodium-calcium exchanger*) está ampliamente distribuido, mientras que NCX2 y NCX3 sólo se encuentran en músculo esquelético y cerebro. En riñón se ha demostrado que es el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} [64].

Bomba de Ca^{2+}

La bomba de Ca^{2+} , también conocida como PMCA1b, es una proteína que atraviesa la membrana basolateral, con dominios citosólicos para la unión de Ca^{2+} y CaM. La acción de la bomba requiere de la fosforilación de algunos de sus residuos de aminoácidos. Dado que su expresión en el duodeno es ampliamente superior a la de NCX1 se sugiere

que sería el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} en el enterocito [64], pero no sería el paso limitante del transporte transcelular.

La expresión de NCX1 y PMCA1b aumenta fundamentalmente por la acción de calcitriol, previa unión al receptor VDR.

3.3.4.3 Transporte vesicular

Si bien parece no haber tenido amplia aceptación, existen autores que mencionan un pasaje de Ca^{2+} por un mecanismo vesicular. Experimentos llevados a cabo en intestino aislado *in situ* en los que se expuso el lumen a 72 mM de Ca^{2+} y luego se realizó inmunohistoquímica para catepsina B (enzima marcadora de lisosomas), muestran antes de la exposición al Ca^{2+} un punteado uniforme en todo el enterocito, y 30 minutos luego de la exposición una acumulación de la marca fluorescente en el centro de la vellosidad intestinal. En experimentos similares con Ca^{2+} 1 mM y posterior fraccionamiento por centrifugación en gradiente de Percoll, se detectó aumento de la radioactividad ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) en vesículas endocíticas y vesículas con receptor de Ca^{2+} a los 20 minutos. A los 30 minutos la radioactividad se encontró en lisosomas. Nemere propone la existencia de dos entradas, una por transportador y otra por vesículas endocíticas, que finalmente ambas se fusionan con lisosomas y migran a la membrana basolateral para su extrusión [77].

3.3.5 Factores que aumentan la absorción de calcio

Fructooligosacáridos: Los fructooligosacáridos, junto con la inulina y prebióticos conocidos como fibra activa, actúan a nivel del metabolismo mineral disminuyendo el pH intestinal por la fermentación colónica. Mejoran la permeabilidad intestinal y provocan la vasodilatación, aumentando la absorción de agua y sales minerales [78].

Fructanos y glúcidos: La fructosa dianhídrido produce aumento de la absorción de Ca^{2+} [79]. Varios sacáridos no digeribles como la difructosa anhídrido III (DFAIII) y difructosa anhídrido IV (DFAIV), fructooligosacárido y maltitol producen aumento del Ca^{2+} citosólico en enterocitos aislados de rata a los 30 segundos. Se ha demostrado en cultivo de células Caco-2 el aumento de Ca^{2+} vía paracelular y aumento del Ca^{2+} citosólico inducido por DFAIII, DFAIV, fructooligosacáridos y rafinosa [80].

Inulina: La inulina aumenta al doble la absorción de Ca^{2+} en intestino grueso de rata, aumentando el pool soluble de Ca^{2+} [81].

Fructanos tipo inulina (Inulin-type fructans): es el nombre genérico de polímeros lineales de fructosa unidos por enlaces β 2-1. Son polímeros indigeribles por enzimas digestivas del intestino delgado. En el colon son transformados por las bacterias en ácidos grasos

de cadena corta con efectos beneficiosos sobre la absorción de Ca^{2+} [82]. Experimentos llevados a cabo con células Caco-2 con fenotipo de células intestinales humanas, demostraron que el ácido cáprico, láurico y linoleico aumentan la absorción de Ca^{2+} por camino paracelular pero no transcelular [83].

Goma Guar: La administración de hidrolizados de goma Guar (*Guar Gum*)^V produce en el colon valores menores de pH y mayor concentración de ácido propiónico y otros ácidos de cadena corta que facilitarían la absorción de Ca^{2+} en este sector del intestino.

Isoflavonas: Las isoflavonas presentes en leguminosas como la soja, si bien parecen actuar primariamente evitando la resorción ósea, también ejercerían efectos no hormonales a otros niveles, probablemente contribuyendo a efectos fisiológicos, tales como el aumento de la absorción intestinal del Ca^{2+} , a pesar de su alto contenido en fitatos y oxalatos [84].

Lactosa: La lactosa incrementa la absorción intestinal de Ca^{2+} [85] independiente de la vitamina D. Aumenta también la expresión de ARNm de FAi y su actividad.

Péptidos: Estudios con sacos evertidos de intestino delgado distal demostraron que los fosfopéptidos de la caseína aumentan el transporte pasivo de Ca^{2+} [86].

Proteínas: Las proteínas desaminadas de soja a las que se les ha eliminado el fitato (hexafosfato de inositol que inhibe la absorción de Ca^{2+}) o los productos de hidrólisis de estas proteínas por enzimas intestinales aumentan la absorción de Ca^{2+} [87].

Prolactina: La prolactina estimula en yeyuno la absorción de Ca^{2+} por mecanismo paracelular, pero no modifica la integridad de uniones estrechas [88].

Fibras solubles: Fibras solubles en agua provenientes de la soja, altamente fermentables, aumentan la absorción de Ca^{2+} y la densidad mineral ósea en ratas gastrectomizadas [89].

3.3.6 Factores que disminuyen la absorción de calcio

Ácido oxálico: el ácido oxálico es el inhibidor más potente de la absorción del Ca^{2+} , ya que forma con el mismo, oxalato de Ca^{2+} que es un compuesto insoluble [90]. Se encuentra en altas cantidades en vegetales como acelga, espinaca, remolacha y cacao.

Fitato: El fitato es un inhibidor de la absorción de Ca^{2+} , por la formación de quelatos insolubles. Se encuentra presente en los cereales pero, cuando éstos se panifican, el ácido fítico es degradado por la fitasa de las levaduras fermentadoras, reduciéndose el

^V *Guar gum* es extraído de las semillas de la leguminosa *Shrub Cyamopsis tetragonoloba* donde actúa como reserva de alimento y agua. Es un galactomano que consiste en β -D-manosa ligada por enlace 1-4 formando una cadena principal con ramificaciones de la posición 6 unida a α -D-galactosa. Es utilizado como espesante y estabilizador de alimentos.

efecto inhibitor [91]. Otros alimentos con alto contenido en fitatos son el cacao en polvo, las semillas de sésamo y girasol, las frutas secas y legumbres como las lentejas.

Fibra dietaria: La fibra alimentaria tiene la capacidad de secuestrar iones de Ca^{2+} en el medio intestinal. No obstante, dado que éstos pueden ser digeridos a nivel colónico por las bacterias intestinales, se produce la liberación del Ca^{2+} , cuya absorción a este nivel puede ayudar a mantener su balance. En vegetarianos, donde presentan elevada ingesta de fibra, no se han descrito problemas de deficiencia de Ca^{2+} [92].

Fósforo: El fósforo es necesario en los períodos de rápido crecimiento óseo pero debe estar en proporciones balanceadas con el Ca^{2+} . Las bebidas colas son ricas en fósforo debido a su contenido en ácido fosfórico utilizado como acidulante. La ingestión excesiva de fosfatos a través de estas bebidas, no permitiría alcanzar la masa ósea pico esperada [93].

Aluminio: Reduce la captación y absorción de Ca^{2+} por afectación de la membrana posiblemente por estrés oxidativo, ya que el efecto se reduce en presencia de glutatión [94].

Fluoruro: Se halló que la exposición a fluoruro en agua de bebida 50 ppm produce disminución de la expresión de ARNm para CBP y VDR en duodeno de ratas [95]. Sin embargo, esta concentración supera ampliamente a los niveles normales (1-2 ppm).

Cadmio: El cadmio disminuye la absorción de Ca^{2+} a nivel intestinal y disminuye la densidad mineral ósea [96].

Vitamina K: Una única dosis de menadiona en pollos disminuyó la absorción de Ca^{2+} lumen-sangre en 30 minutos. También se detectó disminución de la actividad de FAi y PMCA1b lo cual se atribuyó a estrés oxidativo ya que el agregado de glutatión revirtió el fenómeno [97].

Fitoestrógenos: Los fitoestrógenos (genisteína y daidzeína) disminuyeron la absorción transcelular de Ca^{2+} en cultivos de células Caco-2 en presencia de estrógenos, no afectándolo en ausencia de estrógenos [98].

Estrógenos: La deficiencia de estrógenos conduce a un balance negativo de Ca^{2+} y pérdida ósea en mujeres postmenopáusicas. La administración de 17- β -estradiol en ratas ovariectomizadas a dosis farmacológicas produjo aumento de la expresión de ARNm de NCX1, CBP_{28K}, PMCA1b y TRPV5. El efecto de estrógenos sería mediado por vitamina D [99].

3.3.7 Calcio fecal endógeno

La presencia de Ca^{2+} en la luz intestinal proveniente de secreciones de glándulas o células contribuye al Ca^{2+} fecal endógeno. Esta excreción de Ca^{2+} correlaciona en

humanos positivamente con el tamaño corporal y la cantidad de fósforo en la dieta y negativamente con el contenido de proteínas de la carne presente en la dieta [100].

Por todo lo expresado anteriormente se plantean los siguientes interrogantes:

1. *¿Cómo interacciona el calcio con la fosfatasa alcalina intestinal?*
2. *¿Qué efecto tiene el calcio sobre la actividad y estructura de la fosfatasa alcalina intestinal?*
3. *¿Estos efectos son dependientes de la concentración de calcio en la luz intestinal?*
4. *¿Tiene efecto el calcio luminal sobre su propio transporte?*

De esta manera la fosfatasa alcalina intestinal queda relacionada a la absorción de nutrientes de impacto directo en entidades clínicas de importancia. La terapéutica con comprimidos diarios de calcio es común en prevención y tratamiento de enfermedades como la osteoporosis. Los conocimientos que devengan de las investigaciones de esta tesis contribuirán a un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en la entrada en el enterocito, lo cual repercutirá en un mejor aprovechamiento de la medicación y los alimentos con alto contenido de calcio.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción entre el catión calcio y la fosfatasa alcalina intestinal y el efecto que la misma tiene sobre el proceso de absorción del catión.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar fosfatasa alcalina intestinal de la rata.
2. Producir un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina intestinal de rata.
3. Estudiar la interacción calcio-fosfatasa alcalina intestinal de rata y calcular los parámetros que caracterizan a dicha interacción.
4. Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de calcio sobre la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina intestinal de rata.
5. Estudiar cambios estructurales de la fosfatasa alcalina intestinal de rata producidos por la interacción calcio-fosfatasa alcalina.
6. Investigar el efecto de diferentes concentraciones de calcio luminal sobre la actividad de la fosfatasa alcalina intestinal *in vivo*.
7. Determinar variaciones del pH de la luz intestinal ante diferentes concentraciones de calcio.
8. Correlacionar las posibles modificaciones de la actividad enzimática con las posibles modificaciones del pH luminal y la absorción de calcio.
9. Evaluar el transporte de calcio en presencia de un inhibidor de la fosfatasa alcalina intestinal.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la simplicidad y mejor entendimiento de los materiales y métodos utilizados se describen en primer término los experimentos realizados y luego en detalle las técnicas involucradas en cada caso.

5.1 ANIMALES

Los animales empleados fueron ratas hembras endocriadas de la línea IIM/Fm sublínea "m" [101] de 180-220 g de peso corporal, provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Las mismas fueron alimentadas con dieta balanceada para roedores (Gepasa, Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*. Para el manejo de los mismos se siguieron las guías de NIH (*National Institute of Health*, USA) y CCAC (*Canadian Council on Animal Care guidelines*, Canadá) [102,103,104].

5.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DE CALCIO A LA FAI

Doscientos microlitros de solución de FAI purificada (Ver 5.7) se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con soluciones de Ca^{2+} (0-100 mM) ^{VI} en presencia de 740 kBq de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (*New England Nuclear, Research products*, Boston, MA, USA). En 10 μl de la solución se determinó la radiactividad total de la solución utilizando un contador de centelleo líquido Beckman LS 100C como se describe en 5.21. Cien microlitros de las soluciones se ultrafiltraron a 4500 rpm y 4 °C utilizando membranas de ultrafiltración Ultrafree-MC Millipore de 30-kDa de corte (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en el ultrafiltrado. Con los valores de cuentas totales y las del ultrafiltrado, se calcularon las concentraciones de Ca^{2+} libre y fijado. Con dichos datos, se calculó "r" = mol de Ca^{2+} fijado / mol de FAi y "r/c" donde "c" es la concentración de Ca^{2+} libre. El análisis de la regresión lineal de "r/c" en función de "r" permitió determinar el número de sitios de fijación (n) y la constante de afinidad (K) siguiendo el modelo de Scatchard [105].

^{VI} El rango de concentraciones estudiadas fueron seleccionadas tomando como modelo el trabajo de Bronner, *J Cel Biochem* 2003 [62] y en función de la ingesta de calcio de las ratas como se detalla a continuación. Considerando que un rata adulta ingiere 21 gramos de alimento (dieta normocálcica entre 0.9-1.2 g%) y bebe 24 ml de agua y suponiendo ingesta de agua y alimento y disolución simultánea, podría esperarse una concentración de calcio máxima entre 193-258 mM. Si bien estos valores son mayores a los estudiados debemos tener en cuenta que los cálculos son una sobreestimación debido a que no se consideraron las secreciones y el proceso absorbivo.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INHIBICIÓN DE FAi POR EL Ca^{2+}

Se investigó el tiempo necesario para que el Ca^{2+} produzca el efecto inhibitorio sobre la FAi. Muestras conteniendo FAi purificada fueron incubadas con Ca^{2+} 50 mM a 20 °C. Inmediatamente a la adición del Ca^{2+} y cada 20 segundos de intervalo, se tomaron 10 μl y se mezclaron con p-nitrofenilfosfato (pNFF) determinándose la actividad de la enzima como se detalla en 5.11.1. El valor de la actividad decreció durante los primeros minutos obteniéndose un valor estable luego de 3-4 minutos de incubación. En los sucesivos experimentos se incubó el Ca^{2+} con la FAi durante 5 minutos.

5.4 ESTUDIO DE AGREGABILIDAD DE FAi EN PRESENCIA DE Ca^{2+}

5.4.1 Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Para evaluar el efecto de agregabilidad del Ca^{2+} 50 mM sobre la FAi se realizaron electroforesis en presencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (n=4). Finalizada la electroforesis el gel fue lavado para eliminar el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no ligado a la FAi. Se determinó actividad de FAi como se detalla en 5.11.2 para detectar la zona correspondiente a la FAi activa. Las demás calles fueron cortadas y se extrajeron las bandas adyacentes a la FAi revelada (*, Ilustración 11) y la parte superior de cada una de ellas (**, Ilustración 11) correspondientes a sectores de corrida de proteínas de mayor peso molecular. Cada porción se disgregó y se disolvió en la solución de centelleo. Se determinó la radiactividad de cada muestra, medida en cuentas por minuto (cpm), utilizando un contador de centelleo líquido Beckman LS 100C como se describe en 5.21. La radioactividad de cada banda fue expresada como porcentaje de la radiactividad total en la calle.

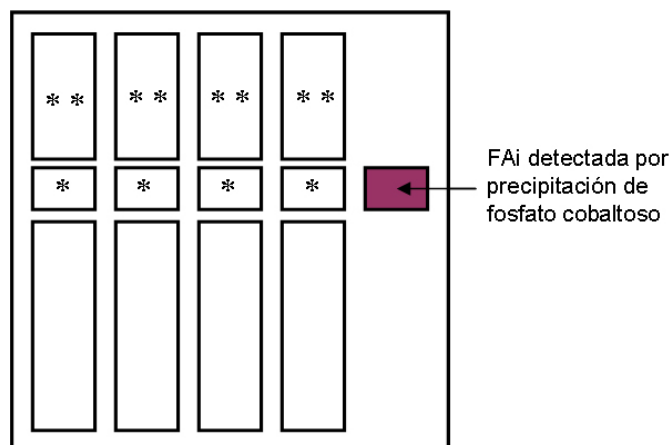


Ilustración 11. Esquema de determinación de la radiactividad en geles de electroforesis de poliacrilamida.

5.4.2 Por polarización de la fluorescencia

Se determinó la asociación molecular de la FAi en presencia de Ca^{2+} utilizando técnica de polarización de la fluorescencia [106]. Para ello se incubó FAi purificada con concentraciones crecientes de Ca^{2+} entre 0 y 100 mM. Los triptófanos de la proteína fueron excitados con una radiación de longitud de onda de 295 nm y se determinó la fluorescencia a 350 nm a temperatura ambiente en un espectrofluorómetro Beckman DU-640 (Fullerton, CA, USA). Con los resultados de fluorescencia obtenidos se calcularon parámetros indicadores de la asociación molecular.

5.4.3 Por cromatografía de exclusión molecular

Se realizó cromatografía de exclusión molecular en Sephadex[®] G200 como se describe en 5.9 de 20 μl de FAi en ausencia (n=4) o presencia (n=4) de Ca^{2+} 50 mM. Se recolectaron fracciones de 0.75 ml y se determinó el volumen de elución de la FAi a través de la medida de absorbancia a 280 nm, actividad de FAi (Ver 5.11.1) y cantidad de FAi por dot blot (Ver 5.12.1) en las diferentes fracciones. Esta técnica no permitió caracterizar el peso molecular de las fracciones de FAi debido a la falta de patrones adecuados, por lo que se realizó Western blot.

5.4.4 Por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (5%) (Ver 5.13) de muestras conteniendo 4 μg de FAi purificada en ausencia (n=8) y presencia de Ca^{2+} 50 mM (n=8) para determinar el efecto del catión a concentración inhibitoria sobre el peso molecular de la enzima. Posteriormente se realizó transferencia a membrana de nitrocelulosa y Western blot para determinar cantidad (Ver 5.15) y actividad de FAi (Ver 5.11.3).

5.4.5 Por electroforesis bidimensional

Se realizó isoelectroenfoque de muestras conteniendo 4 μg de FAi purificada en ausencia (n=8) y presencia de Ca^{2+} 50 mM (n=8) para determinar el efecto sobre el punto isoelectrico (pI) y el peso molecular del Ca^{2+} a concentración inhibitoria. Posteriormente 4 calles fueron empleadas para determinar el pI de la FAi por Western blot (Ver 5.15), mientras las 4 calles restantes fueron sometidas a la segunda dimensión como se describe a continuación.

Luego del isoelectroenfoque, 4 calles de FAi pretratadas con Ca^{2+} 0 mM (n=4) y otras 4 incubadas por 5 minutos con Ca^{2+} 50 mM (n=4) fueron sometidas a electroforesis en

geles de poliacrilamida (5%) en dirección perpendicular a la corrida de la primera dimensión. Luego de la electroforesis, se realizó Western blot como se describe en 5.15.

5.5 ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN Y REVERSIBILIDAD DE LA UNIÓN Ca^{2+} -FAi

Con el fin de estudiar la reversibilidad del efecto inhibitorio del Ca^{2+} sobre la FAi se evaluó el efecto del etilenglicol-bis(2-aminoetileter)N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA, Sigma Co, St Louis, MO, USA) antes y después de su exposición al Ca^{2+} .

5.5.1 Tratamiento de la FAi con EGTA después de la exposición al Ca^{2+}

Muestras de FAi purificada fueron expuestas a Ca^{2+} 50 mM (n=4) durante 5 minutos para producir inhibición y agregación molecular. Posteriormente la mezcla fue incubada con concentraciones crecientes de EGTA 0-50 mM para eliminar el Ca^{2+} de la solución (constante de disociación del quelato Ca^{2+} -EGTA: 1×10^{-11} M). La concentración final de EGTA aseguraba una concentración iónica de Ca^{2+} menor a 7×10^{-4} mM, sin producir modificaciones de la concentración de magnesio (Mg^{2+}) (constante de disociación del quelato Mg^{2+} -EGTA: 6.3×10^{-6} M) [107] (Ver Apéndice 7.2). Se obtuvieron muestras antes y después del tratamiento con Ca^{2+} , y luego de las sucesivas adiciones de EGTA para determinar la actividad de FAi (Ver 5.11.1). Se realizó Western blot (Ver 5.15) de las soluciones obtenidas antes y después del tratamiento con Ca^{2+} y después de la adición de EGTA 50 mM.

5.5.2 Tratamiento de la FAi con EGTA antes de la exposición al Ca^{2+}

El objetivo de este experimento fue verificar si el EGTA afectaba *per se* la actividad de la FAi o por quelación del Mg^{2+} y/o Zn^{2+} .

Muestras de FAi purificada fueron tratadas con EGTA 50 mM (n=4) durante 5 minutos. En esta situación, no se agregó Ca^{2+} a la solución por lo que el EGTA podría actuar como quelante de Mg^{2+} o Zn^{2+} . En función de las constantes de afinidad del EGTA por el Mg^{2+} y el Zn^{2+} las concentraciones teóricas de los iones fueron 1.29×10^{-7} M y 1×10^{-17} M, respectivamente (Ver Apéndice 7.2).

Posteriormente la solución fue tratada con concentraciones de Ca^{2+} crecientes hasta obtener una concentración final de Ca^{2+} iónico de 50 mM en cuya condición la concentración de Mg^{2+} alcanza un valor aproximado de 1 mM.

Antes y después del tratamiento con EGTA y en todas las muestras hasta alcanzar una concentración de Ca^{2+} libre de 50 mM se determinó la actividad de la FAi (Ver 5.11.1).

5.6 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CALCIO-FAi IN VIVO Y SU RELACIÓN CON LA ABSORCIÓN DE CALCIO

5.6.1 Por intestino aislado *in situ*

El intestino aislado *in situ* (Ver 5.16) de cada rata del grupo control (n=6) se llenó con 2 ml de una solución Tris 25 mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 160 mM, pH 7.5 y cada rata de los grupos tratados (n=6 por grupo) recibió 2 ml de la misma solución más el agregado de CaCl₂ en concentraciones 1, 10, 50 y 100 mM. Se seleccionaron dichas concentraciones en función de su efecto sobre la FAi *in vitro*. Las concentraciones de 1 y 10 mM resultaron ser estimuladoras de la enzima, mientras que las concentraciones de 50 y 100 mM produjeron inhibición de la misma.

De cada rata se extrajeron muestras de 50 µl del contenido de la luz intestinal, al inicio del experimento, a los 10 y 20 minutos de haber colocado la solución.

Al finalizar el experimento se extrajeron las porciones del duodeno y se procesaron según 5.22 para luego determinar la actividad y expresión de la FAi por técnicas histoquímicas (Ver 5.23) e inmunohistoquímica (Ver 5.24), respectivamente.

A pesar que los experimentos *in vivo* fueron realizados con soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca²⁺, la concentración en la proximidad de la membrana podría no ser exactamente la misma que la concentración en el seno de la solución por efecto del proceso de absorción. Por lo tanto, con la finalidad de conocer el efecto del Ca²⁺ sobre la actividad de la FAi se llevaron a cabo determinaciones de actividad enzimática posteriores a la incubación de preparados histológicos de duodeno con diferentes concentraciones de Ca²⁺. Después de la desparafinación, los preparados histológicos de duodeno de ratas controles, se expusieron a una solución conteniendo Tris 25 mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 160 mM, pH 7.5 y EGTA 50 mM. La finalidad del EGTA fue eliminar el posible Ca²⁺ preexistente de los preparados histológicos. Se procedió al lavado para eliminar todo el EGTA de la muestra y se incubó con concentraciones de Ca²⁺ conocidas (0, 1, 10, 50 y 100 mM). La actividad de FAi fue determinada por histoquímica (Ver 5.23).

5.6.2 Por sacos duodenales evertidos

Por medio de la técnica de sacos duodenales evertidos (Ver 5.17) las mucosas intestinales fueron expuestas a una solución Tris 1mM^{VII}, MgCl₂ 1mM, glucosa 160 mM, Ca²⁺ 1, 10, 50 o 100 mM, pH 9 y la serosa a la misma solución pero sin Ca²⁺ (n=4), con agitación constante y temperatura de 37 °C. Se tomaron muestras de la solución de incubación, en contacto con mucosa a tiempo inicial, 10 y 20 minutos y de la solución de llenado de los sacos en contacto con la serosa al finalizar el experimento (20 minutos) para determinar cantidad (Ver 5.15) de FAi liberada en el compartimiento luminal y seroso. Asimismo se tomaron muestras en medio ácido para inhibir la acción FAi y determinar fosfato (Ver 5.20).

El porcentaje de Ca²⁺ absorbido se determinó en muestras de la solución mucosa en función del descenso del Ca²⁺ luminal empleando una técnica espectrofotométricamente (Ver 5.18).

El pH se determinó en la solución mucosa cada 1 minuto a lo largo de todo el experimento empleando un pHmetro HANNA HI 9017 (Ver 5.19).

Experimentos de sacos duodenales evertidos también fueron llevado a cabo en presencia de L-fenilalanina, inhibidor de la FAi donde se determinó la variación del pH (Ver 5.19) y el porcentaje de absorción de Ca²⁺ (Ver 5.18).

Previo a la realización de los experimentos de sacos duodenales evertidos mencionados se realizaron ensayos preliminares (Ver Apéndice 7.3) a fin de establecer si la FAi era la responsable de las modificaciones del pH en presencia de diferentes concentraciones de Ca²⁺ luminal.

Para ello se llevaron a cabo los siguientes ensayos *in vitro* con FAi purificada:

- Determinación del pH empleando diferentes cantidades de FAi purificada.
- Determinación del pH empleando diferentes sustratos de FAi (β -glicerofosfato y pNFF).
- Determinación del pH ante la presencia de L-fenilalanina, inhibidor de FAi.

Como comprobación final de que la FAi era la responsable de los cambios de pH se realizaron pruebas con sacos evertidos duodenales en presencia de L-fenilalanina.

^{VII} La baja concentración de Tris utilizada, diferente a la empleada en los experimentos de intestino aislado *in situ*, se debió a que se pretendió tener una baja capacidad buffer en la solución para una mejor observación de las variaciones de pH.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

5.7 PURIFICACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL

Debido a que no existía en el mercado FAi de rata, se procedió a su purificación. Para ello se utilizó un método que básicamente emplea extracción de lípidos con n-butanol, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico [108,109]. La purificación consta de los siguientes pasos:

- Disección del intestino delgado de la rata luego de la eutanasia.
- Corte longitudinal del intestino y raspado de la mucosa contra el borde de un portaobjeto.
- Preparación de una suspensión de mucosa al 30% P/V en buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2, utilizando un homogenizador (Ultraturrax, Ika-werk Janke&Kunkel, D7813 Staufen, Germany) a 20000 rpm a 4 °C.
- Extracción de lípidos por tratamiento de la suspensión con igual volumen de n-butanol. Luego de una hora de agitación a 4 °C, este proceso libera la enzima de su unión a la membrana.
- Centrifugación a 10000 rpm (15000 g) 30 minutos a 4 °C (centrífuga refrigerada Z-323-K-Hermle Labortechnik GmBh. Wehingen.F.R, Germany). Esto permite obtener tres fracciones: una fase superior butanólica que contiene los lípidos, una fase intermedia de fracciones insolubles y una fase inferior acuosa donde se concentra la actividad de FAi.
- Precipitación de las proteínas de la fase acuosa con igual volumen de acetona -20 °C.
- Centrifugación a 6000 rpm 15 minutos a 4 °C. Disolución del precipitado obtenido en buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2. Esto permite obtener las proteínas en el pellet.
- Aprovechando la propiedad de la FAi de no ser degradada por la tripsina [17], se incubó la solución obtenida en el paso anterior con 5 mg de tripsina durante 10 horas a temperatura ambiente. Las proteínas contaminantes son degradadas a péptidos de menor peso molecular, que serán eliminados en el paso siguiente.
- Cromatografía sobre Sephadex[®] G200 (Sephadex[®] - Pharmacia Fine Chemical - Uppsala Sweden) (Ver 5.9). Se determinó la actividad de FAi como se detalla en 5.11.1 y las fracciones con alta actividad de FAi se juntaron y se precipitaron con acetona a -20 °C. El precipitado se redisolvió en buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2.
- La solución del paso anterior se cromatografió utilizando DEAE celulosa (Sigma Co, St Louis, MO, USA), con buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2 con un gradiente de NaCl de 0 a 0.3 M. Se juntaron las fracciones que presentaron actividad de FAi y se precipitaron con acetona a -20 °C. Se centrifugó a 10000 rpm a -10 °C y el precipitado se redisolvió en el buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2.

Se determinó la actividad de la enzima (Ver 5.11.1) y concentración de proteínas (Ver 5.8) en las muestras obtenidas en los diferentes pasos. Con estos valores se calculó la actividad específica (actividad de FAi/concentración de proteínas). Con los valores de actividad específica se calculó el factor de purificación (FP) en cada etapa de la purificación (FP = actividad específica en un dado paso de purificación *100 / actividad específica inicial).

- La solución resultante con una concentración entre 0.2-0.4 mg/ml se fraccionó y se guardó a -20 °C.
- En el momento del inicio de esta tesis tampoco existía en forma comercial anticuerpos anti-FAi de rata por lo que una etapa final de purificación por electroforesis en geles de poliacrilamida fue utilizada para obtener FAi de alta pureza para la producción de anticuerpos anti-FAi. Para la detección de la banda de migración de FAi en los geles de poliacrilamida se desarrolló una técnica para su detección como se detalla en 5.11.2.

5.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se empleó el método de Bradford. Este método se basa en la reacción del colorante Coomassie Brillante Blue con las proteínas. Como testigo se utilizó albúmina sérica bovina (BSA). Sensibilidad de la técnica 1-10 µg [110,111].

5.9 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Se utilizó una columna de 40 cm de largo y 0.5 cm de radio interno rellena con Sephadex® G200 (Pharmacia Fine Chemical - Uppsala Sweden). La cromatografía se realizó con buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8.2, utilizando una bomba peristáltica P1 (Pharmacia Biotech - Uppsala Sweden) y un flujo de 0.1 ml/min a 4 °C. A la salida de la columna se conectó un sensor ultravioleta Optical Unit UV-1 (Pharmacia Biothec - Uppsala Sweden). La determinación de absorbancia a 280 nm fue registrada con un registrador VOM 5E (Bausch & Lomb. USA). El eluido de la columna se recogió con un colector ISCO 270 (Instrumentation Specialities Company Inc, Lincoln, Nebr. USA) en fracciones acordes a las necesidades experimentales.

La columna se calibró utilizando como patrones de peso molecular inhibidor de tripsina (23 kDa), albúmina sérica bovina (60 kDa), gama-globulina humana (150 kDa). Por falta de patrones de peso molecular adecuados, esta técnica no fue utilizada para el cálculo de peso molecular pero si para observar cambios en esta variable.

5.10 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL DE RATA

La producción de anticuerpos anti-FAi se realizó por inoculación de la enzima purificada (Ver 5.7) a cobayos hembras adultos. Se extrajo por punción cardíaca una muestra de sangre basal antes de realizar la primera inoculación (M1), manteniendo al animal con anestesia inhalatoria con éter sulfúrico. Se separó el suero de las muestras obtenidas y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La muestra a inocular a los cobayos se obtuvo luego de la realización de electroforesis en gel de poliacrilamida de FAi purificada de rata. Una de las calles fue revelada como se menciona en 5.11.2 para determinar la zona de migración de la proteína. Las zonas adyacentes de las demás calles fueron cortadas, disgregadas con un potter y disueltas en buffer fosfato salino (PBS)^{VIII}.

Cien microlitros de esta solución obtenida conteniendo 0.06 mg de FAi se emulsionaron con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund (ACF) y se inyectaron en forma subcutánea e intramuscular en diferentes sitios a 2 cobayos adultos hembras. A los 15 días, se extrajo una muestra de sangre (M2) para corroborar la aparición de anticuerpos anti-FAi como consecuencia de la respuesta inmune. Luego de 30 días se realizó una nueva inoculación de 100 μl de FAi purificada emulsionada con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund (AIF). A los 15 días se extrajo sangre nuevamente (M3). Se repitieron 2 reinoculaciones de FAi con AIF y se obtuvieron nuevas muestras (M4 y M5) [112].

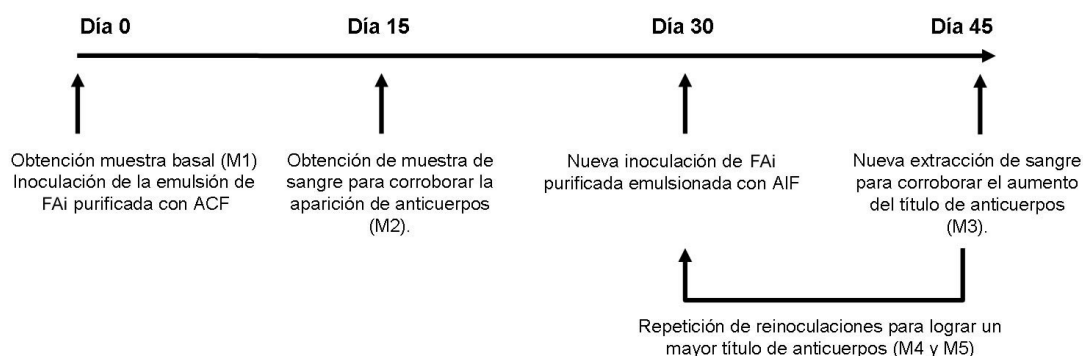


Ilustración 12. Esquema del proceso de producción de anticuerpos anti-FAi.

El incremento en la producción de anticuerpos se observó empleando la técnica de inmunodifusión en agar al 1.5% en buffer PBS según la técnica de Outcherlony [113]. Se colocaron 2 ml de agar fundido sobre un portaobjeto ubicado sobre una superficie

^{VIII} PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 5.7 mM, pH 7.4.

horizontal. Se realizaron pocillos de 2 mm de diámetro separados 0.5 mm entre sí. En el pocillo central se colocó 5 μ l de FAi purificada y en los pocillos ubicados a 5 mm del pocillo central se colocó 5 μ l de cada uno de los sueros obtenidos en los sucesivos pasos de inmunización (M1, M2, M3, M4, M5). El gel se mantuvo en cámara húmeda por 48 horas, a 4 °C. Pasado este tiempo se observó la aparición de arcos de precipitación. La formación de arcos de precipitación, de tamaño creciente, demostró la presencia de anticuerpos anti-FAi en las sucesivas muestras.

5.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA

Para la determinación de la actividad enzimática se emplearon diferentes técnicas en función del sitio de localización de la enzima.

5.11.1 En solución

La determinación de la actividad de la FAi se realizó utilizando p-nitrofenilfosfato (pNFF) como sustrato a pH 9.8 en buffer dietanolamina (DEA) 1M, (kit comercial, Wiener Lab, Rosario, Argentina). Esta solución se incubó con alícuotas de las muestras conteniendo FAi y se determinó el cambio de absorbancia a 405 nm durante 1 minuto en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11. Los datos obtenidos se analizaron con el software PECSS (*Perkin Elmer Computerized Spectroscopy Software. Perkin Elmer Corporation Norwalk, CT. USA*). Para la determinación de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción (E) del p-nitrofenilfosfato (pNFF) determinado para nuestras condiciones de trabajo (279 unidades Abs.litro/cm. μ mol pNFF) (Ver Apéndice 7.1). La actividad de la enzima se calculó utilizando la fórmula $\text{Actividad} = \text{Absorbancia}/E \cdot b$, donde $b = 1$ cm. Los resultados se expresaron en μ mol o pmol pNFF hidrolizado $\text{seg}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ dependiendo del valor obtenido. El método presentó un coeficiente de variación intraensayo entre 1.6 y 3.1% para el rango de actividades calculado.

5.11.2 En geles de poliacrilamida

La técnica empleada se basa en que la FAi hidroliza β -glicerofosfato liberando fosfato y en presencia de nitrato cobaltoso genera un precipitado de color violáceo de fosfato cobaltoso $[\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2]$. Básicamente, luego de la electroforesis, se realiza un lavado del gel 3 veces con agua destilada (10 minutos cada vez), incubación del gel con β -glicerofosfato de sodio 1M (pH 8.2) y nitrato cobaltoso 1M (proporción 1:1) hasta la observación de las bandas de precipitación del fosfato cobaltoso. Finalmente se lava con

agua hasta eliminar el nitrato cobaltoso sin reaccionar, se procede al secado del gel, digitalización de la imagen y posterior análisis utilizando un software específico.

Sobre la imagen digital se determinó el área (A) de las bandas del precipitado de fosfato cobaltoso y la intensidad (I) de las mismas con lo que se obtuvo el producto Axl.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida con diferentes cantidades de FAi (0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 μg). Se reveló con la técnica mencionada y se halló una correlación altamente significativa entre Axl y μg FAi sembrada ($r = 0.953$, $p < 0.01$).

Se determinó el coeficiente de variación intraensayo. A tal fin se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida donde se sembró 0.6 μg de FAi de rata purificada en 7 calles. Se calculó Axl de cada banda y se determinó media, desvío standard y coeficiente de variación intraensayo (CV 2.6%). Para la determinación del coeficiente de variación interensayo se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en 5 días diferentes. En cada día se sembraron 0.6 μg de la misma solución de FAi purificada. Se determinó Axl y se calculó media, desvío standard y coeficiente de variación interensayo (CV 11.3%).

5.11.3 En membrana de nitrocelulosa

Para detectar la actividad de FAi en membranas de nitrocelulosa se empleó el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) en buffer Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM (APSB), pH 9.5 [15]. Luego de la electroforesis y transferencia se lavaron las membranas con PBS y se incubaron durante 30 minutos en una solución conteniendo BCIP. Los sectores con FAi se revelaron por la aparición de un cromóforo color índigo producido por la acción de la enzima sobre el sustrato.

5.11.4 Sobre preparados histológicos en la membrana del enterocito

La actividad de la FAi sobre preparados histológicos se determinó a través de la técnica histoquímica empleando como sustrato el BCIP en buffer APSB durante 30 minutos a pH 9.5 [15] como se describe en 5.23.

5.12 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FOSFATASA ALCALINA

Para la determinación de la cantidad de FAi en una muestra se emplearon diferentes técnicas:

5.12.1 Dot blot

Muestras de FAi (0.5 μ l) fueron sembradas sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond TM-C extra, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) [114]. Luego del lavado con PBS pH 7.4 se incubó la membrana 12 horas con leche descrema en polvo 5% P/V y Tween 0.1% V/V. Posteriormente a un nuevo lavado con PBS se incubó la membrana con suero de cobayo conteniendo anticuerpos anti-FAi en dilución 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Para eliminar los anticuerpos no ligados se procedió a un nuevo lavado con PBS. Luego se incubó con anticuerpos secundarios (anti-IgG de cobayo, origen conejo conjugado con peroxidasa, Sigma, St Louis, MO, USA) en dilución 1/10000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con PBS y reveladas con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) a pH 5 y peróxido de hidrógeno. Se obtuvieron imágenes digitales y se determinó la densidad óptica integrada (IOD) con el software GelPro Analyzer 3.0.

Cantidades conocidas de FAi (0.0025-0.025 μ g/ μ l) fueron procesadas de la misma manera como muestras patrones. Las concentraciones fueron calculadas a partir de los parámetros de la regresión de las muestras patrones ya que la IOD siguió una función lineal a la concentración de FAi en las concentraciones estudiadas ($IOD = 17450 \times [FAi]$, $r = 0.926$, $p < 0.0001$). El método presentó un coeficiente de variación intraensayo de 6% a 0.025 μ g/ μ l y 37% a 0.0025 μ g/ μ l.

5.12.2 Western blot

La concentración de la FAi luego de electroforesis o isoelectroenfoque se realizó luego de Western blot (Ver 5.15) sobre imágenes digitales de la membrana de nitrocelulosa.

5.12.3 Inmunohistoquímica

La cantidad de la FAi sobre imágenes digitales de los preparados histológicos se determinó a través de la técnica inmunohistoquímica empleando como sustrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) [115] o 3,3'-diaminobenzidina (DAB) [116] como se describe en 5.24.

5.13 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Las muestras a ser utilizadas en PAGE, se disolvieron en un buffer especial para electroforesis (Tris 1.52% P/V, glicerol 20% V/V, dodecilsulfato sódico [SDS] 2% P/V, 2-mercaptoetanol 2% V/V, azul bromofenol 0.001% P/V, pH 6.8). Es habitual la realización de PAGE en condiciones desnaturalizantes, por lo cual la muestra con el buffer descripto

se calienta a 100 °C [117]. Dado que en varias oportunidades se realizó la determinación de la actividad de la FAi, se evitó el calentamiento a dicha temperatura.

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% [111]. El porcentaje de acrilamida y el pH de los geles se seleccionaron en función del peso molecular de la fosfatasa alcalina: 180±5 kDa y su pI: 4.5. El gel utilizado está compuesto por un gel de resolución de pH 8.8 y un gel stacking de pH 6.8. La electroforesis se realizó con el mismo buffer en los compartimientos anódicos y catódicos (Tris 1.51% P/V, glicina 7.2% P/V, SDS 0.5% P/V, pH 8.3).

La electroforesis se llevó a cabo con una fuente EPS 3500 (Pharmacia Biothec - Uppsala Sweden). La intensidad corriente utilizada fue de 10 mA durante el tiempo que las muestras migraron en el gel de stacking y de 5 mA por el tiempo que las muestras corrieron por el gel de resolución. Durante la electroforesis el voltaje se mantuvo variable de manera de ajustar la intensidad de corriente a los valores indicados.

En el caso de realizar tinción con Coomassie Brilliant Blue para la detección de proteínas, la fijación se realizó con solución metanol 50% V/V, ácido acético glacial 10% P/V, agua 40% V/V durante 2 horas. Posteriormente el gel se incubó con Coomassie Brilliant Blue como solución colorante (metanol 50% V/V, Coomassie Brilliant Blue R 0.05% V/V, ácido acético 10% V/V, agua 40% V/V) durante 12 horas. Luego de este tratamiento el gel se decoloró con una solución metanol 5% V/V, ácido acético 7% V/V, agua 88% V/V.

En las calles en que se determinó actividad de FAi se procedió como se detalla en 5.11.2 y en las que se determinó radioactividad se procedió de acuerdo a lo mencionado en 5.21.

Como patrones de peso molecular se utilizaron: apoferritina (443 kDa), fibrinógeno (341 kDa), gama globulina equina (158 kDa), albúmina sérica bovina dímero (132 kDa) y monómero (66 kDa) (Sigma Co, St. Louis, MO, USA).

5.14 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La misma se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descripto por O'Farrell [118].

5.14.1 Primera Dimensión: Isoelectroenfoque

Las muestras a ser utilizadas en isoelectroenfoque (IEF), fueron disueltas en un buffer especial para electroforesis: Tris 1.52% P/V, glicerol 20% V/V, 2-mercaptoetanol 20% V/V, azul bromofenol 0.001% P/V, pH 6.8).

Se realizó isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (5%) con gradiente de pH 3.5-9.5 (Ampholine PAGplate, Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) con una corriente de 0.33 mA/cm de ancho de gel, siendo la corriente eléctrica constante. El voltaje varió según

cambios en la resistencia. Las soluciones a utilizar en ambos electrodos fueron: H_3PO_4 1M para el ánodo y NaOH 0.5 M para el cátodo.

Se emplearon como patrones: rojo metilo (pI 3.8), inhibidor de tripsina (pI 4.5), albúmina sérica bovina (pI 5) y anhidrasa carbónica (pI 6). Las calles conteniendo los patrones de peso molecular fueron reveladas con Coomassie Brilliant Blue como se detalló en 5.13.

5.14.2 Segunda Dimensión: Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida SDS.

Luego del isoelectroenfoco, las calles fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% en dirección perpendicular a la corrida de la primera dimensión desde el extremo catódico. Luego de la electroforesis, se realizó Western blot como se describe en 5.15. Como solución anódica y catódica se utilizó Tris 1.51% P/V, glicina 7.2% P/V, SDS 0.5% P/V, pH 8.3.

5.15 WESTER BLOT

Luego de realizar la electroforesis (Ver 5.13) o isoelectroenfoco (Ver 5.14), el gel se lavó con buffer de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.15 M, metanol 20% V/V, pH 8.3) durante 10 minutos. Las proteínas fueron transferidas en una celda de transferencia (Multiphor II, Novablot electrode, Pharmacia Biothec - Uppsala Sweden) provista de electrodos de grafito (Novablot electrode, Amersham, Pharmacia Biotech - Uppsala Sweden) a membrana de nitrocelulosa (Hybond TM-C extra, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA). La transferencia se realizó a 0.35 mA/cm^2 de gel durante 2 horas.

Previo a la inmunodetección las membranas fueron colocadas en rojo Ponceau 10 g/L con la finalidad de identificar la posición de los patrones de peso molecular utilizados [119]. Luego las membranas fueron lavadas con agua para eliminar el colorante.

Posteriormente las membranas fueron incubadas con PBS-Tween (Na_2HPO_4 1.14% P/V, NaH_2PO_4 0.24% P/V, NaCl 0.59% P/V, Tween 0.1% V/V, pH 7.5) e incubadas 12 horas con leche descremada en polvo 5% P/V en PBS-Tween. Luego de lavar la membrana con PBS pH 7.4 se la incubó con suero de cobayo conteniendo anticuerpos anti-FAi (Ver 5.12) en dilución 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente a un nuevo lavado se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios (anti-IgG de cobayo, origen conejo conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA) en dilución 1/10000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas nuevamente con PBS y reveladas con diaminobenzidina (DAB) o con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Se obtuvieron imágenes digitales de las membranas de nitrocelulosa, las que se analizaron con el software GelPro Analyzer 3.0 como se describe en 5.25.2.

Se calculó la relación de frente ($R_f = \text{distancia de migración de la proteína} / \text{distancia de migración de frente}$) de los patrones de peso molecular y de la proteína, valores que se utilizaron para estimar las masas moleculares de las proteínas en estudio.

5.16 INTESTINO AISLADO IN SITU

Las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con uretano (120mg/100g de peso corporal) y mantenidas en camillas termostatzadas. Durante el experimento la temperatura ambiente se mantuvo entre 21-22 °C. Se aislaron 6 cm del duodeno *in situ* [120,121], mediante dos ligaduras, la primera a nivel del píloro (Ilustración 13 e Ilustración 14). En el extremo distal se colocó un catéter, a través del cual se introdujo la solución a investigar y se obtuvieron muestras del contenido luminal.

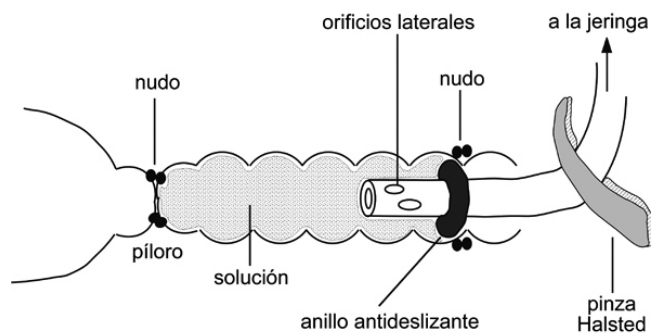


Ilustración 13. Esquema de intestino aislado *in situ*. Modificado de Rigalli A, 2009 [120].

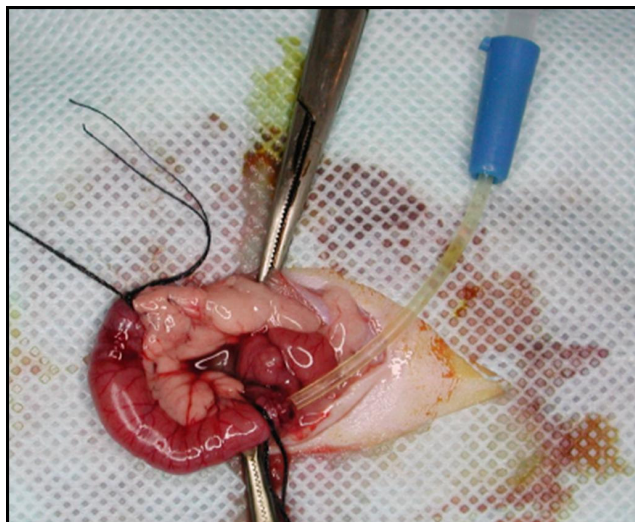


Ilustración 14. Modelo de intestino aislado *in situ*. Rigalli A, 2009 [120].

5.17 SACOS DUODENALES EVERTIDOS

Se realizó eutanasia de los animales por inyección intracardiaca de KCl previa profunda anestesia inhalatoria. Luego de una laparotomía mediana de 3-4 cm, se localizó el píloro y se extrajo el duodeno. Se realizó la eversión del duodeno [122] de manera tal que la mucosa intestinal quedara expuesta a la solución exterior y la superficie serosa hacia el interior del saco (Ilustración 15). Cada duodeno fue dividido en tres segmentos de igual tamaño cada uno.

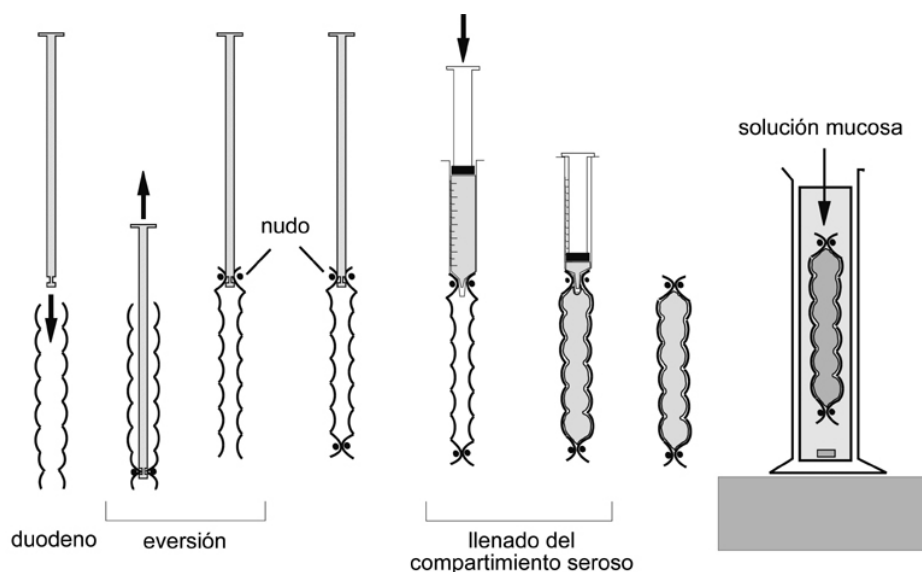


Ilustración 15. Esquema eversión duodeno. Modificado de Rigalli A, 2009 [122]

5.18 DETERMINACIÓN DE Ca^{2+}

La determinación de Ca^{2+} se realizó espectrofotométricamente a 570 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11 con un kit comercial (Ca Color, Wiener Lab, Rosario, Argentina) a partir de las muestras de la luz intestinal de los experimentos de sacos duodenales evertidos. Los datos obtenidos se analizaron con el software PECSS (*Perkin Elmer Computerized Spectroscopy Software. Perkin Elmer Corporation Norwalk, CT. USA*).

5.19 DETERMINACIÓN DEL pH

Las determinación del pH en los experimentos de sacos evertidos se llevaron a cabo cada 1 minuto durante el tiempo de realización del experimento utilizando un pHmetro HANNA HI 9017 (Woonsocket, RI, USA).

5.20 DETERMINACIÓN DE FOSFATO

La concentración de fosfato se midió espectrofotométricamente a 340 nm con un kit comercial (Fosfatemia UV, Wiener Lab, Rosario, Argentina) a partir de las muestras de la luz intestinal de los experimentos de sacos duodenales evertidos. Se determinó el cambio de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11. Los datos obtenidos se analizaron con el software PECSS (*Perkin Elmer Computerized Spectroscopy Software. Perkin Elmer Corporation Norwalk, CT. USA*).

5.21 DETERMINACIÓN DE Ca²⁺ RADIOACTIVO

La determinación de radioactividad del ⁴⁵Ca²⁺ se realizó utilizando un contador de centelleo líquido Beckman LS 100C (Fullerton, CA, USA) utilizando líquido de centelleo (tolueno 65% V/V, alcohol absoluto 35% V/V, difeniloxazol 0.266% P/V). En cada muestra se determinaron las cuentas por minuto (cpm) con un error ≤ 2%.

5.22 PREPARACIÓN DE MUESTRAS HISTOLÓGICAS

5.22.1 Obtención del espécimen

La obtención del tejido a estudiar se realizó mediante el uso de un bisturí para evitar desgarros. Se realizaron cortes en piezas pequeñas de no más de 5 mm de espesor para favorecer la posterior inclusión en parafina y se lo fijó con formol-PBS al 10% durante 72 horas [123].

5.22.2 Inclusión en parafina

Para la inclusión en parafina se realizó en primera instancia una deshidratación mediante pasajes sucesivos en alcoholes de concentración creciente para facilitar la penetración del agente inclusor, posteriormente se llevó a cabo la aclaración mediante el pasaje en xilol y finalmente la inclusión propiamente dicha mediante la utilización de parafina a una temperatura de 60°C.

5.22.3 Preparación del bloque

La realización del bloque de parafina se llevo a cabo empleando moldes plásticos y anillos de inclusión.

5.22.4 Cortes

Se realizaron cortes de 5 µm con un micrótopo (Minot-Mikrotm Typ 1212. Leitz, Wetzlar, Germany) y fueron adheridos a un portaobjeto mediante albúmina glicerizada de Mayer.

5.22.5 Coloración

Se realizaron tinciones del tejido con hematoxilina-eosina. Para ello se realizó en primer término la eliminación de la parafina con xilol y seguidamente la rehidratación mediante una serie de soluciones alcohólicas de graduación decreciente.

Finalmente se cubrió con un cubre objeto montado con bálsamo de Canadá.

5.23 HISTOQUÍMICA

Los cortes histológicos fueron procesados según se detalló en 5.22. Se procedió a la desparafinación con xilol durante 10 minutos y a continuación rehidratación por pasajes sucesivos en alcoholes de concentraciones crecientes y agua. Los preparados se dejaron secar a temperatura ambiente y se los incubó durante 30 minutos con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) en buffer APSB, pH 9.5 [123,124]. Este compuesto es un sustrato para la FAi que genera al hidrolizarse un compuesto insoluble de color índigo. Posteriormente se procedió a la coloración con eosina 1% para favorecer el contraste visual, realización de pasajes en alcoholes de concentración decreciente y xilol para finalizar con el montaje. Los preparados histológicos fueron analizados como se detalla en 5.25.

La especificidad de la reacción fue confirmada por una importante inhibición de la actividad enzimática en presencia de L-fenilalanina (16 mM).

5.24 INMUNOHISTOQUÍMICA

A diferencia de la técnica anteriormente descrita el colado de los preparados destinados a inmunohistoquímica [123,125] se realizó con cola vinílica, en dilución 1/10, dejándolos secar 90 minutos a temperatura ambiente. Una vez adheridos los cortes a los portaobjetos se dejan secar nuevamente. La desparafinación se realizó iniciando los pasajes en xilol durante 30 minutos, y luego metanol por 2 minutos. Al paso anterior se le agregó agua oxigenada de 100 volúmenes al 2.5% dejándolo en recipiente tapado durante 30 minutos. A continuación se procedió a la inmersión en alcohol 96° y alcohol 70° durante 10 minutos cada uno. Se lavó 3 veces en buffer Tris 0.05 M, pH 7.6 durante 5 minutos. Luego se realizó el desbloqueo antigénico en microondas colocando los portaobjetos en citrato de sodio 1% P/V pH 6, durante 3 minutos a 100 °C. Se dejó enfriar 15 minutos y se procedió al lavado 3 veces en buffer Tris 0.05 M, pH 7.6 durante 5 minutos. Se incubaron los preparados histológicos con anticuerpo primario anti-FAi, en dilución 1/500, durante 60 minutos. A continuación, previo lavado, se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de cobayo, origen conejo conjugado con peroxidada (Sigma Co, St. Louis, MO, USA), en dilución 1/5000, durante 60 minutos. Luego, previo

lavado con buffer Tris, se incubaron con sustrato de peroxidasa: 3-amino-9-etil carbazole (AEC) hasta observar la aparición macroscópica de la coloración. Finalmente se procedió a un nuevo lavado y montaje con glicerina para la realización del análisis de los preparados histológicos como se detalla en 5.25.

5.25 ANÁLISIS DE IMÁGENES DIGITALES

5.25.1 Determinaciones sobre preparados histológicos

Los preparados histológicos obtenidos en 5.23 y 5.24 se digitalizaron mediante un microscopio (Olympus, Zeiss, West Germany) con una cámara fotográfica adaptada (Olympus SP-350, Japan). Utilizando las imágenes digitalizadas y un software específico se determinó la densidad óptica integrada (IOD) del compuesto formado en los diferentes experimentos.

Cinco sitios de los cortes histológicos fueron aleatoriamente seleccionados y se trazó una línea paralela a la membrana del enterocito (Ilustración 16) en la zona coloreada por la presencia de FAi. El software calcula un valor medio de la IOD en el sector seleccionado (línea roja) y nos provee una imagen que describe el cambio de intensidad a lo largo de dicha línea. Se midió la IOD y la corrección de la posible coloración inespecífica se realizó por medida de la IOD en el lumen intestinal.

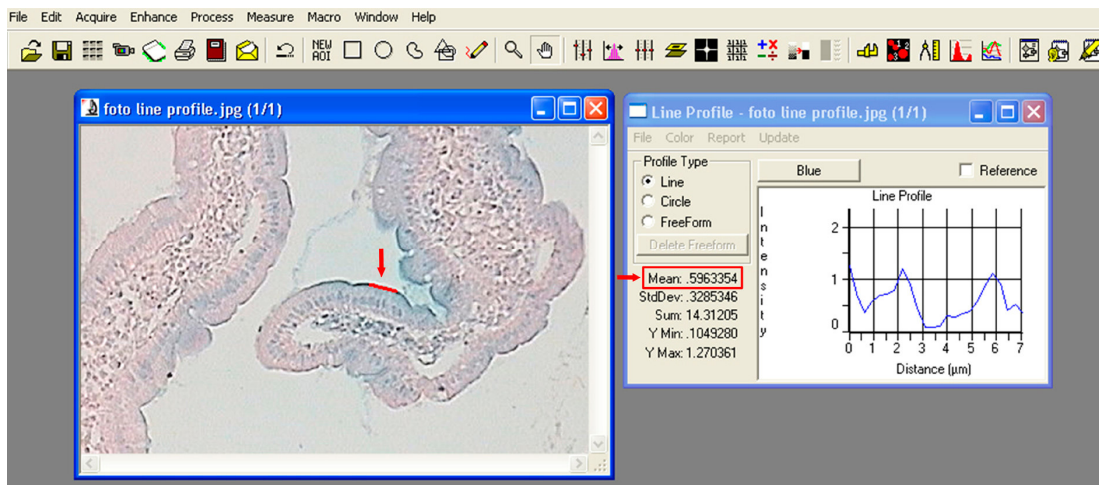


Ilustración 16. Determinación de la IOD en preparados histológicos.

5.25.2 Determinaciones sobre membrana de nitrocelulosa

Las membranas de nitrocelulosa reveladas, se escanearon (HP M1120 LaserJet, Taiwan) y se analizaron empleando un software específico (Gel-Pro Analyzer 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Una vez seleccionadas las calles (Ilustración 17, flecha azul) y sus respectivas bandas (flecha celeste), se observó la absorbancia de cada calle en función del peso molecular (flecha negra) y se calculó la absorbancia relativa de cada banda (flecha roja), valor que representa la cantidad de proteína en cada banda respecto de la cantidad total de proteínas en la calle.

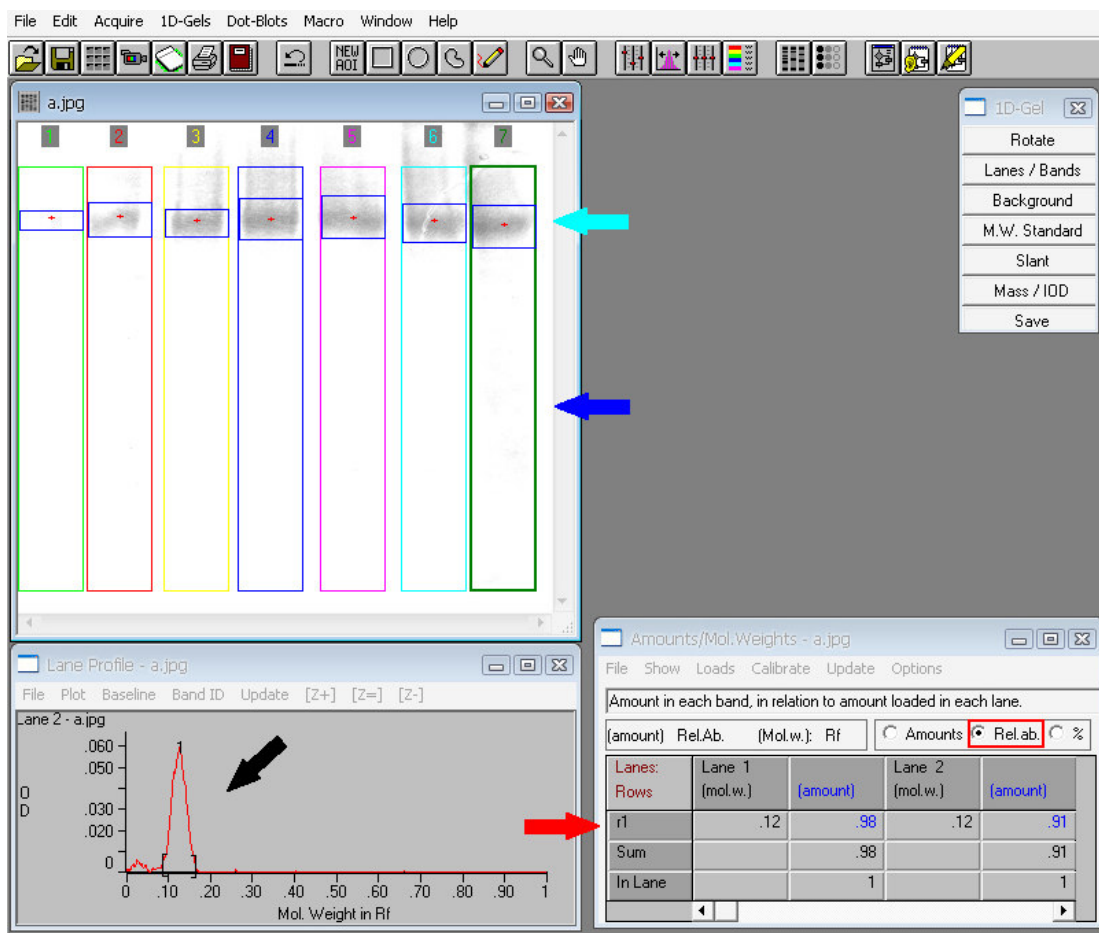


Ilustración 17. Determinación de la cantidad de FAi.

5.26 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto del tiempo sobre la cinética de inactivación de FAi en presencia de Ca^{2+} (6.3) se analizó utilizando una función de decaimiento exponencial de una fase y el ajuste de los datos se realizó con regresión no lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados. El mismo tipo de análisis se utilizó para analizar los datos de pH obtenidos en los experimentos de sacos duodenales evertidos en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} (6.8.1 y 6.8.3)

Se utilizó regresión lineal y la función se obtuvo por el método de los mínimos cuadrados para: a) investigar el efecto de diferentes concentraciones de calcio sobre la actividad de FAi en solución o en geles de poliacrilamida (6.4); b) evaluar el efecto del EGTA sobre la actividad de FAi (6.6).

El modelo de interacción entre la FAi y el Ca^{2+} (6.2) se investigó utilizando el modelo de Scatchard y los parámetros de la interacción (número de sitios y constante de afinidad) se calculó a partir de los parámetros de la recta que ajusta "r/c" (número de moles de calcio por mol de FAi/concentración de calcio libre) en función de "r".

Cuando se requirió comparaciones de dos medias se utilizó test de Student para datos independientes (6.5, 6.6, 6.7).

Cuando se requirió comparaciones de más de dos muestras de datos independientes se utilizó ANOVA a un criterio de clasificación y las diferencias entre las medias se evaluaron con el test de Bonferroni (6.8.1, 7.5) o el test de tendencia lineal (6.7, 7.5)

En todos los casos se consideraron diferencias significativas si $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

Para un mejor entendimiento, los resultados claves de esta tesis se expresarán en esta sección, mientras que resultados complementarios serán expuestos en la sección APÉNDICE.

Además se recuerda que se empleará la abreviatura FAi para hacer referencia a la enzima activa que es un dímero de subunidades idénticas. Cada una de dichas subunidades se denominará “monómero”, mientras que una especie de mayor peso molecular se denominará “agregado molecular”.

6.1 PURIFICACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL

La Tabla 2 muestra el factor de purificación logrado en los diferentes pasos del proceso de purificación.

Tabla 2. Determinación del factor de purificación.

<i>Etapa</i>	<i>Actividad específica (mmol/seg.g de proteínas)</i>	<i>Factor de purificación</i>
Extracto crudo (M1)	2.1×10^{-4}	1
Extracción con butanol (M2)	7.5×10^{-4}	3.6
Precipitación con acetona (M3)	1.7×10^{-3}	8.1
Cromatografía en Sephadex® (M4)	6.0×10^{-3}	28.6
Cromatografía en DEAE celulosa (M5)	1.2×10^{-2}	57.1

El progreso en el factor de purificación se observó adicionalmente a través del revelado de actividad de FAi en geles de poliacrilamida por precipitación de fosfato cobaltoso (Ilustración 18).

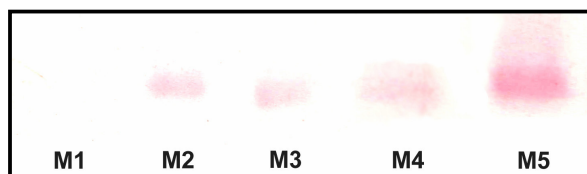


Ilustración 18. Gel de poliacrilamida de los pasos de purificación revelado por precipitación de fosfato cobaltoso.

En los experimentos que se detallan a continuación se utilizó la solución obtenida en el último paso, cuyo factor de purificación fue 57.1.

6.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DE CALCIO A LA FAI

El estudio de los parámetros de fijación se realizó a través del análisis de la relación “ r/c ” en función de “ r ” (Ver 5.2). El análisis de las gráficas reveló un comportamiento diferente de acuerdo a la concentración de Ca^{2+} investigada.

A concentraciones de Ca^{2+} menores a 10 mM la relación “ r/c ” resultó una función lineal de “ r ” ($p < 0.05$), sugiriendo unión del Ca^{2+} a la FAi siguiendo un modelo de “ n ” sitios independientes de igual afinidad (Ilustración 19). La constante de afinidad (k) de la interacción fue de $19.1 \pm 8.4 \text{ mM}^{-1}$ y la FAi presentó 7.8 ± 4.4 sitios de unión al Ca^{2+} .

Con concentraciones de Ca^{2+} entre 20-100 mM la cinética no siguió el modelo mencionado. El análisis de “ r ” en función de la concentración de Ca^{2+} libre (c) indicó que la FAi ligaría 6300 ± 1300 iones por mol de proteína asumiendo un peso molecular de 168 kDa.

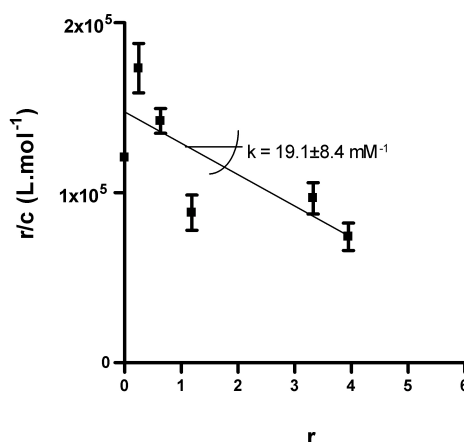


Ilustración 19. Gráfica de Scatchard para determinación de constante de afinidad (pendiente de la recta) y número de sitios de fijación (abscisa al origen). Modificado de Brun LR, 2006 [126].

6.3 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INHIBICIÓN DE FAi POR EL Ca^{2+}

En solución, la presencia de Ca^{2+} 50 mM, disminuyó la actividad enzimática de FAi siguiendo una función exponencial de una fase. A 20 °C, en 62.6 ± 2.0 segundos se obtuvo un 50% de la inhibición máxima alcanzada. Por esta razón en los siguientes experimentos la incubación con Ca^{2+} se realizó durante 5 minutos.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAi EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+}

Cuando se analizó la actividad de FAi *in vitro* en función de diferentes concentraciones de Ca^{2+} (0-100 mM), tanto con la determinación de actividad de FAi en solución (Ver 5.11.1) como en geles (Ver 5.11.2), se observó un efecto bifásico dependiente de la concentración del catión (Ilustración 20) [126].

A concentraciones menores a 10 mM la enzima incrementó la actividad linealmente en función de la concentración de Ca^{2+} (en solución: $r = 0.946$, $p < 0.01$; en gel: $r = 0.721$, $p < 0.05$; regresión lineal). Con concentraciones de Ca^{2+} superiores a 20 mM la relación fue inversa a la mencionada (en solución: $r = -0.703$, $p < 0.05$; en gel: -0.773 , $p < 0.05$; regresión lineal).

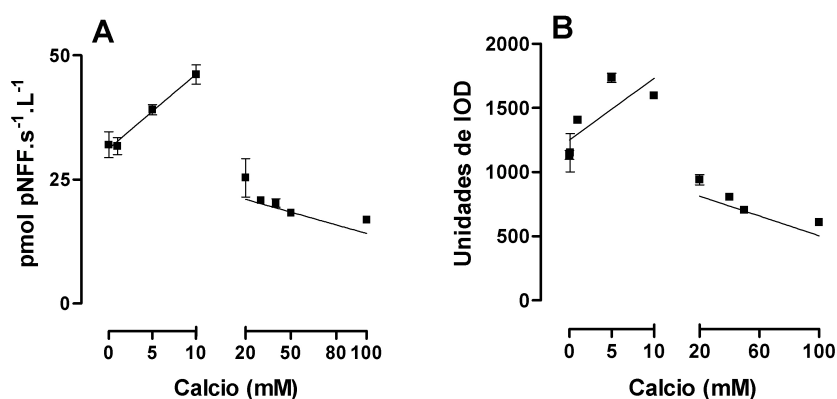


Ilustración 20. Actividad de FAi *in vitro*, en función de la concentración Ca^{2+} . Panel A: actividad en solución empleando pNFF como sustrato. Panel B: actividad de FAi luego de electroforesis en geles de poliacrilamida determinado por precipitación de $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$. IOD: densidad óptica integrada.

Modificado de Brun LR, 2006 [126].

6.5 ESTUDIO DE AGREGABILIDAD DE FAi EN PRESENCIA DE Ca^{2+}

6.5.1 Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Estudios preliminares de electroforesis en geles de poliacrilamida con Ca^{2+} 50 mM y en presencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mostraron un patrón de distribución de la radiactividad compatible con un proceso de agregación de la proteína (Tabla 3). Como control, se realizó Western blot a los geles y se halló que la radiactividad fue indetectable en las porciones donde no se detectó la presencia de FAi.

Tabla 3. Distribución de la radiactividad ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) en PAGE.

<i>Calcio (mM)</i>	<i>Bandas de FAi activa (%)</i>	<i>Bandas de mayor peso molecular que la FAi activa (%)</i>
0	100 ± 8.1	0 ± 0.2
50	11 ± 2.4	89 ± 5.4

6.5.2 Por polarización de la fluorescencia

Los resultados obtenidos por polarización de la fluorescencia mostraron un leve cambio en la rigidez de la molécula, los cuales indujeron a pensar que el Ca^{2+} podía ocasionar agregación molecular.

Si bien los resultados mostrados hasta el momento (6.5.1 y 6.5.2) no fueron concluyentes sobre el proceso de agregación de FAi inducida por Ca^{2+} , indicaron que este proceso podría ser posible y merecía seguir siendo investigado.

6.5.3 Cromatografía de exclusión molecular

Por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex[®] G200 se detectaron 2 formas de FAi de diferente peso molecular, aún en ausencia Ca^{2+} (Ilustración 21). La forma de mayor peso molecular presentó un volumen de elución de 14.4±1.1 ml (n=4), mientras que la forma de menor peso molecular de 21.7±0.9 ml (n=4).

La actividad específica de la enzima fue estimada por el cociente del área bajo la curva de la actividad de FAi (Ver 5.11.1) y el área bajo la curva de la concentración para cada una de las formas (Ver 5.12.1). La forma de menor peso molecular, tuvo una actividad específica de 1.74 pmoles de pNFF/s.µg de proteína, mientras que la de mayor peso molecular presentó una actividad específica de 0.15 pmoles de pNFF/s.µg de proteína.

Cuando el mismo experimento fue llevado a cabo en presencia de Ca^{2+} 50 mM, se incrementó la cantidad de FAi de alto peso molecular a expensas de una disminución de la cantidad de FAi de bajo peso molecular sin modificaciones significativas del volumen de elución (Ilustración 21).

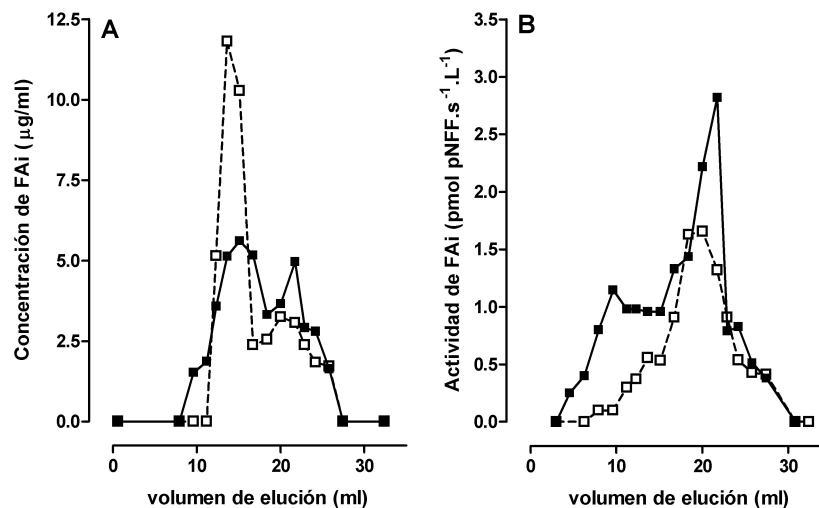


Ilustración 21. Determinación de la concentración de FAi (Panel A) y de la actividad de FAi (Panel B) en ausencia (—■—) y presencia (---□---) de Ca²⁺ 50 mM. Modificado de Brun LR, 2006 [126].

Conclusión parcial: Estos resultados sugieren que la incubación con Ca²⁺ produciría un aumento del peso molecular de la FAi.

Para caracterizar los pesos moleculares se procedió a la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot.

6.5.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot

Coincidentemente con lo hallado empleando cromatografía de exclusión molecular (6.5.3), el Western blot reveló 2 bandas que reaccionaron con el anticuerpo anti-FAi (Ilustración 22, panel A). Se determinaron los pesos moleculares de cada banda, siendo de 475±45 kDa y 168±6 kDa (n=4) para la banda 1 y 2 respectivamente. La banda de bajo peso molecular presentó un peso coincidente con la FAi, mientras que la banda de alto peso molecular correspondería a un “agregado molecular” coincidente con un trímero debido que se empleó una muestra de FAi purificada.

Se estimó la concentración de proteínas en cada banda por medida de la absorbancia relativa de cada banda respecto de la absorbancia total de la calle (Abs Rel).

Cuando la FAi no fue incubada con Ca²⁺, la Abs Rel fue de 0.38±0.03 y 0.23±0.07 para las bandas 1 y 2 respectivamente. Mientras que cuando la FAi fue incubada con Ca²⁺ 50 mM, se modificó la proporción de las bandas 1 y 2, siendo la Abs Rel 0.52±0.04 y 0.08±0.01, respectivamente.

Cuando se determinó la actividad de la FAi en membrana de nitrocelulosa (Ver 5.11.3), la misma sólo fue detectada en la fracción de bajo peso molecular (Ilustración 22, panel B) indicando que la forma de alto peso molecular sería inactiva.

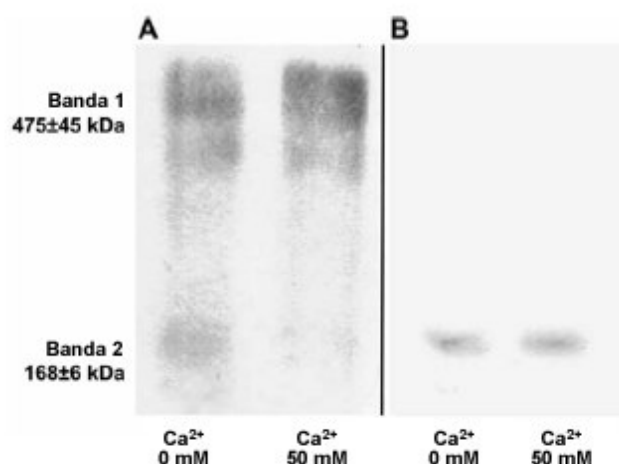


Ilustración 22. Panel A: Western blot de FAi en presencia y ausencia de Ca²⁺ 50 mM. Panel B: determinación de actividad de FAi. Modificado de Brun LR, 2006 [126].

6.5.5 Electroforesis bidimensional

El punto isoeléctrico de la FAi en ausencia de Ca²⁺ (4.35±0.02, n=4), se incrementó de manera significativa en presencia de Ca²⁺ 50 mM (4.85±0.06, n=4), (T de student, p<0.05), no hallándose diferencias entre el pl del dímero y del “agregado molecular” (Tabla 4). Los pesos moleculares determinados no difieren de lo calculado en 6.5.4.

Tabla 4. Peso molecular y punto isoeléctrico de FAi en presencia y ausencia de Ca²⁺ 50 mM obtenido por electroforesis bidimensional.

Calcio (mM)	Forma molecular	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
0	FAi	162±13 (n=4)	4.35±0.02
0	Agregado molecular	469±33 (n=4) *	4.35±0.02
50	FAi	168±39 (n=4)	4.85±0.06 **
50	Agregado molecular	441±62 (n=4) *	4.85±0.06 **

* Representa diferencias significativas respecto de la FAi.

** Representa diferencias significativas respecto de la enzima sin calcio.

Conclusión parcial: El calcio produce agregación molecular afectando la actividad de FAi pero no produciría cambios importantes de su estructura.

6.6 ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN Y REVERSIBILIDAD DE LA UNIÓN Ca^{2+} -FAi

6.6.1 Tratamiento de la FAi con EGTA antes de la exposición al Ca^{2+}

El tratamiento con EGTA 50 mM produjo disminución de la actividad de FAi (Ilustración 23A) (T de Student, $p < 0.05$). La adición de Ca^{2+} en concentración creciente hasta lograr una concentración de Ca^{2+} libre de 50 mM reprodujo el efecto bifásico ya observado con la enzima *in vitro* (6.4). La actividad enzimática se incrementó en función de la concentración de Ca^{2+} ($r = 0.96$, regresión lineal, $p < 0.05$) alcanzando un máximo a 10-20 mM de Ca^{2+} , y luego la actividad disminuyó en función de la concentración de Ca^{2+} ($r = -0.66$, regresión lineal, $p < 0.05$) (Ilustración 23B). Este resultado asegura que el EGTA no produce modificación de la actividad de FAi por quelación del Mg^{2+} o Zn^{2+} (Ver Apéndice 7.2).

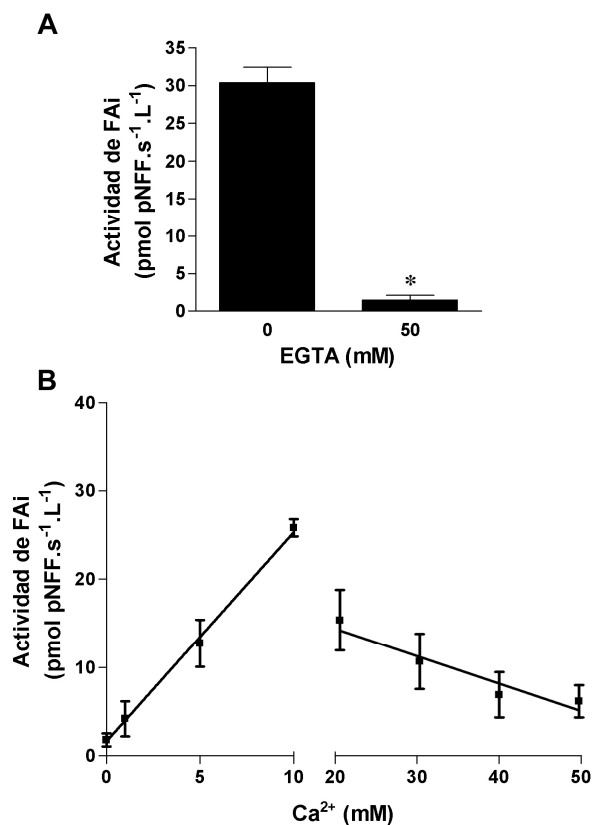


Ilustración 23. Panel A: Actividad de FAi antes y después de la incubación con EGTA. Panel B: Actividad de FAi luego del agregado de diferentes concentraciones de Ca^{2+} , graficado en función de la concentración de Ca^{2+} libre.

6.6.2 Tratamiento de la FAi con EGTA después de la exposición al Ca^{2+}

Coincidentemente con experimentos previos, la actividad de la FAi disminuyó significativamente luego de la incubación con Ca^{2+} 50 mM (Ilustración 24A) (T de Student, $p < 0.05$), pero la actividad se mantuvo en valores inhibitorios a pesar de tratar la muestra con concentraciones crecientes de EGTA (Ilustración 24B). Esta adición de EGTA produjo una modificación gradual de la concentración de Ca^{2+} desde 50 a 7×10^{-4} mM.

El Western blot de la FAi antes (Ilustración 25, calle 1) y después (Ilustración 25, calle 2) del agregado de Ca^{2+} 50 mM mostró un incremento del agregado molecular y disminución del dímero de la FAi, tal como había sido demostrado en 6.5.4. El tratamiento con EGTA y por ende la quelación del Ca^{2+} produjo un descenso del agregado molecular y la aparición del monómero (Ilustración 25, calle 3) (Ver Apéndice 7.2).

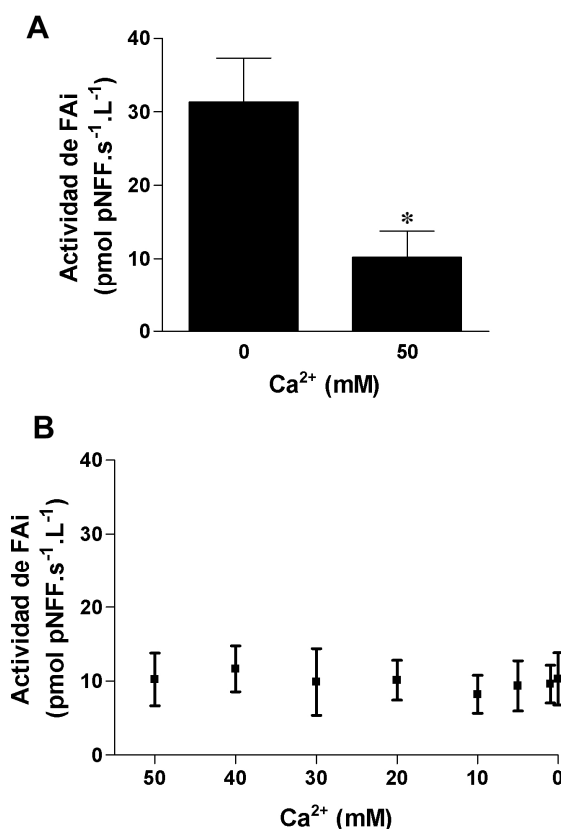


Ilustración 24. A: Actividad de FAi antes y después de la incubación con Ca^{2+} 50 mM.

B: Actividad de FAi luego del agregado de diferentes cantidades de EGTA, graficado en función de la concentración de Ca^{2+} libre.

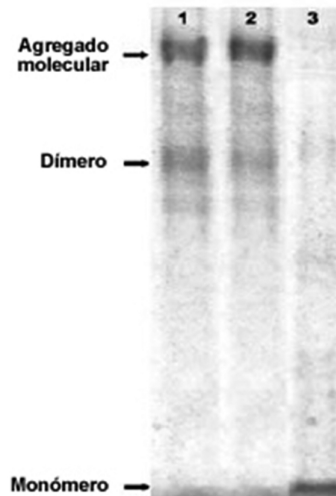


Ilustración 25. Western blot antes (calle 1) y después (calle 2) de la adición de Ca^{2+} 50 mM y después de lograr una concentración de Ca^{2+} libre igual 0 mM por adición de EGTA al medio de incubación (calle 3).

Conclusión parcial: La modificación en la actividad enzimática se debería a que el calcio desplazaría al Zn^{2+} o al Mg^{2+} de la molécula de FAi o participaría en la formación del dímero.

6.7 EFECTO DEL CALCIO SOBRE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA FAi *IN VIVO*

La actividad de FAi fue determinada en un modelo *in vivo* de intestino aislado *in situ* por una técnica histoquímica (Ver 5.23). Se determinó la actividad de la FAi en la membrana en cepillo del duodeno en cortes histológicos pre y post exposición por 20 minutos a diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

En el grupo control, no se halló diferencias de actividad enzimática en función del tiempo de exposición por incubación a la solución sin Ca^{2+} (Unidades de IOD, 0 min: 0.44 ± 0.15 , 20 min: 0.46 ± 0.18 , T de Student $p > 0.05$) (Ilustración 26).

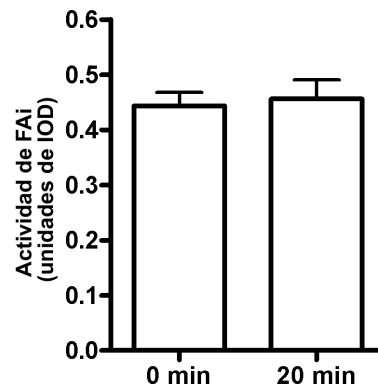


Ilustración 26. Actividad de FAi previa y posterior a la incubación en la solución empleada sin Ca^{2+} .

Por su parte, la actividad de FAi a los 20 minutos se incrementó a medida que lo hizo la concentración de Ca^{2+} luminal (ANOVA, Test de tendencia lineal, $p < 0.05$) (Ilustración 27).

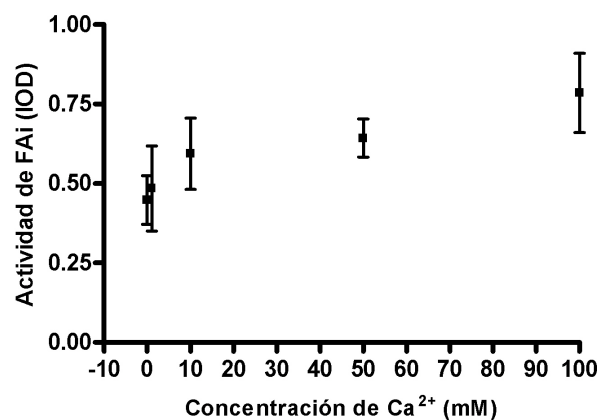


Ilustración 27. Actividad de FAi *in vivo* en función de la concentración de Ca^{2+} luminal.

La Ilustración 28 muestra un corte histológico representativo de cada grupo experimental de la actividad de FAi en las vellosidades intestinales.

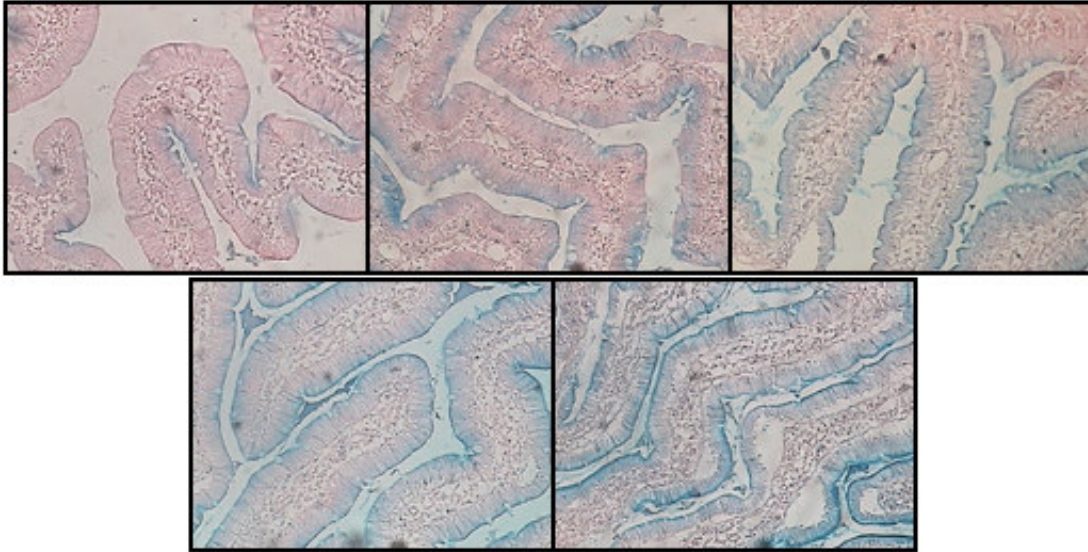


Ilustración 28. Imágenes (4x) representativas de las determinaciones de actividad de FAi por histoquímica. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Ca^{2+} 0, 1, 10, 50 y 100 mM.

Aunque el tiempo de exposición no fue prolongado como para observar cambios en la expresión de proteínas, se realizó un estudio inmunohistoquímico con el objetivo de corroborar que esta modificación de la actividad enzimática no se deba a un cambio de expresión de la FAi. Tal como lo demuestra la Ilustración 29, no se observaron diferencias significativas en la expresión de la enzima en los diferentes grupos luego de la exposición al Ca^{2+} (ANOVA, Test de tendencia lineal, $p < 0.05$) (Ilustración 29).

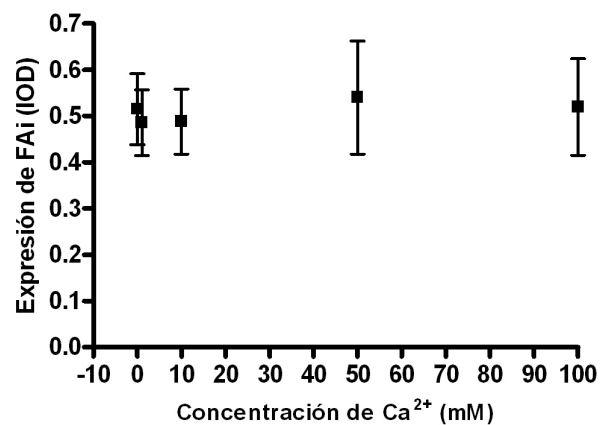


Ilustración 29. Expresión de FAi *in vivo* en función de la concentración de Ca^{2+} luminal.

La Ilustración 30 muestra un corte histológico representativo de la determinación de la cantidad de FAi en las vellosidades intestinales.

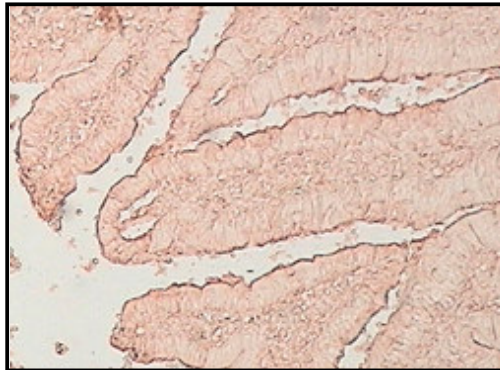


Ilustración 30. Imagen (4x) representativa de las determinaciones de expresión de FAi por inmunohistoquímica.

Conclusión parcial: A diferencia de lo observado *in vitro*, el Ca^{2+} aumenta la actividad de la FAi de las microvellosidades y dicho cambio no es producido por aumento de la expresión.

Debido a que el efecto del Ca^{2+} observado *in vivo* (Ilustración 27) no fue coincidente con el efecto observado *in vitro* (Ilustración 20) se plantearon dos posibilidades. Por un lado, y recordando que el modelo de intestino aislado es un modelo que durante la experiencia mantiene el transporte de Ca^{2+} , se especuló que las concentraciones establecidas en la luz intestinal podrían no ser tales en la membrana y bien podrían ser concentraciones que estén dentro del rango estimuladorio *in vitro* de la FAi. Por otro lado, bien podría la enzima tener diferente comportamiento ante la exposición al Ca^{2+} dado que en los experimentos *in vitro* la misma se encontraba de manera soluble, mientras que en los experimentos *in vivo* se localizaba anclada a la membrana del enterocito. El glicocáliz, por constituir una interfase entre la membrana plasmática y el contenido luminal, podría contribuir a que las concentraciones de calcio en el seno de la luz intestinal no sean exactamente idénticas a las de la proximidad de la membrana.

Para dilucidar esto, se determinó la actividad de FAi en la membrana del enterocito sobre cortes histológicos de animales controles (Ca^{2+} 0 mM) después de exponerlos a EGTA de manera de disminuir la concentración de Ca^{2+} a valores despreciables y posterior adición de concentraciones de Ca^{2+} conocidas (0, 1, 10, 50 y 100 mM).

Como se observa en la Ilustración 31 la actividad de FAi se incrementó linealmente (ANOVA, Test de tendencia lineal, $p < 0.05$) en función de la concentración de Ca^{2+} , mostrando un patrón similar al observado en la Ilustración 27 obtenido en los experimentos *in vivo*.

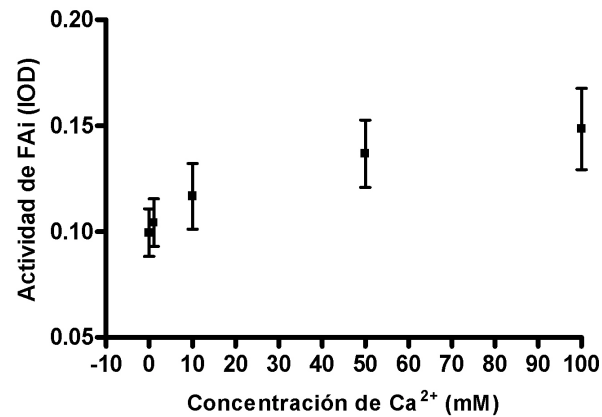


Ilustración 31. Actividad de FAi anclada a membrana en función de la concentración de Ca^{2+}

Conclusión parcial: Estos experimentos confirman que la enzima responde de manera diferente a las concentraciones de Ca^{2+} estudiadas, en estado soluble versus anclada a la membrana y que *in vivo* la actividad de la FAi se incrementa a medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} luminal.

También se halló un fenómeno de interacción Ca^{2+} -FAi *in vivo* el cual se detalla en el Apéndice 7.5, del cual se desconoce el rol que cumpliría.

6.8 RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAi CON LA ABSORCIÓN DE CALCIO

6.8.1 MODIFICACIONES DEL pH LUMINAL EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO

Utilizando sacos duodenales evertidos, se determinó la variación del pH en la solución en contacto con la mucosa duodenal en función del tiempo en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} luminal (1, 10, 50 y 100 mM).

Se observó un descenso del pH en todos los grupos (Ilustración 32), dependiente de la concentración de Ca^{2+} luminal, alcanzando las concentraciones de Ca^{2+} 50 y 100 mM los valores más bajos.

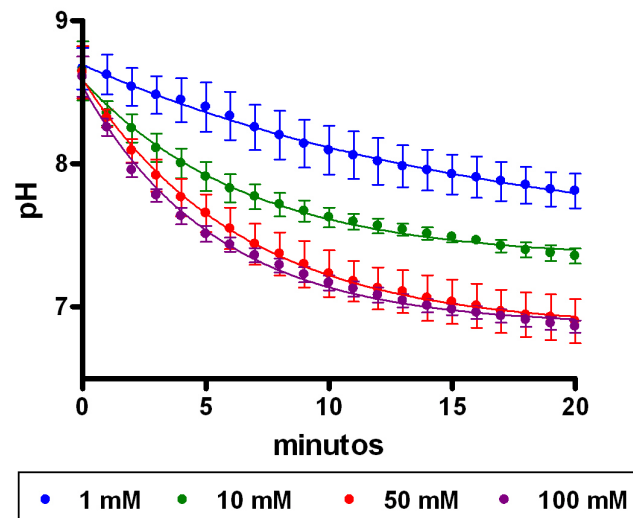


Ilustración 32. Efecto de diferentes concentraciones de Ca^{2+} sobre el pH luminal en experimentos de sacos duodenales evertidos.

Para realizar la comparación entre los grupos se seleccionaron los valores cada 5 minutos (Tabla 5). En la misma se observa un descenso significativo del pH en la solución mucosa de los grupos con 10, 50 y 100 mM respecto del grupo 1 mM a partir de los 5 minutos, mientras que la diferencia de los grupos 50 y 100 mM respecto del grupo de 10 mM se observa a los 10 minutos (ANOVA, post test de Bonferroni, $p < 0.05$). No se hallaron diferencias entre los grupos 50 y 100 mM a lo largo de todo el experimento.

Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de Ca^{2+} sobre el pH luminal en experimentos de sacos evertidos duodenales.

Minutos	Concentración de Ca^{2+} (mM)			
	1	10	50	100
0	8.665±0.14	8.650±0.21	8.640±0.18	8.607±0.28
5	8.397±0.17	7.910±0.10 ^a	7.655±0.13 ^a	7.510±0.11 ^{ab}
10	8.095±0.17	7.625±0.07 ^a	7.232±0.16 ^{ab}	7.167±0.10 ^{ab}
15	7.925±0.14	7.4875±0.03 ^a	7.035±0.15 ^{ab}	6.982±0.08 ^{ab}
20	7.810±0.12	7.355±0.05 ^a	6.900±0.15 ^{ab}	6.862±0.09 ^{ab}

^a Representa diferencia significativa respecto del grupo 1 mM.

^b Representa diferencia significativa respecto del grupo 10 mM.

6.8.2 ABSORCIÓN DE CALCIO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO LUMINAL

La cantidad de Ca^{2+} absorbido en experimentos de sacos duodenales evertidos no siguió una función lineal de la concentración de Ca^{2+} luminal, sino una función de crecimiento exponencial asintótico. El máximo teórico de Ca^{2+} absorbido según esta función sería de 34.17 ± 7.07 μmoles (Ilustración 33).

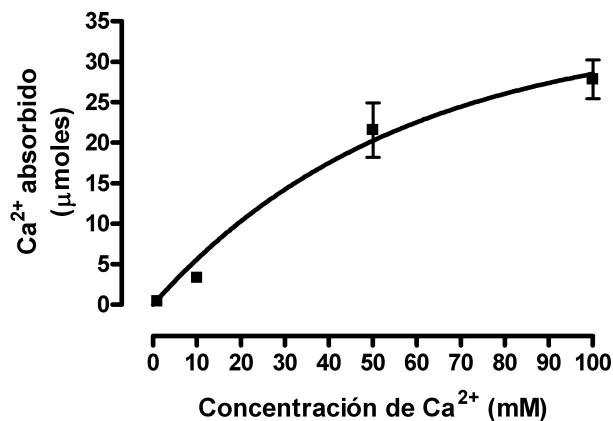


Ilustración 33. Cantidad de Ca^{2+} absorbido en función de la concentración de Ca^{2+} luminal en experimentos de sacos duodenales evertidos.

Esto indica que en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} luminal el porcentaje total de Ca^{2+} luminal que se absorbe es menor (Ilustración 34), existiendo una reducción significativa en los grupos de 50 y 100 mM respecto a los grupos 1 y 10 mM.

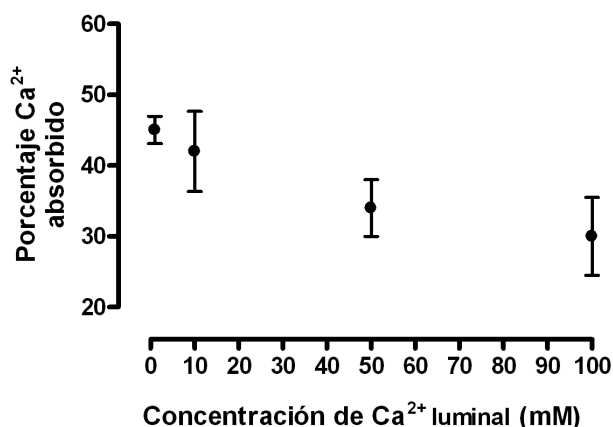


Ilustración 34. Porcentaje de Ca^{2+} absorbido en función de la concentración de Ca^{2+} luminal en experimentos de sacos duodenales evertidos.

Conclusión parcial: La fracción de absorción de Ca^{2+} disminuye a medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} luminal. Esta reducción se encuentra relacionada con el aumento de la actividad de la enzima y con un mayor descenso del pH, el cual podría ser el responsable de la disminución de la fracción de absorción de Ca^{2+} por inhibición del canal TRPV6.

6.8.3 MODIFICACIONES DEL pH Y ABSORCIÓN DE CALCIO EN PRESENCIA DE L-FENILALANINA, INHIBIDOR DE LA FAi.

Cuando los experimentos de sacos duodenales evertidos se llevaron a cabo en presencia de L-fenilalanina, inhibidor de la FAi, se halló un menor descenso del pH para todas las concentraciones de Ca^{2+} luminales estudiadas comparando con los valores de pH obtenidos en ausencia de L-fenilalanina (Ilustración 35).

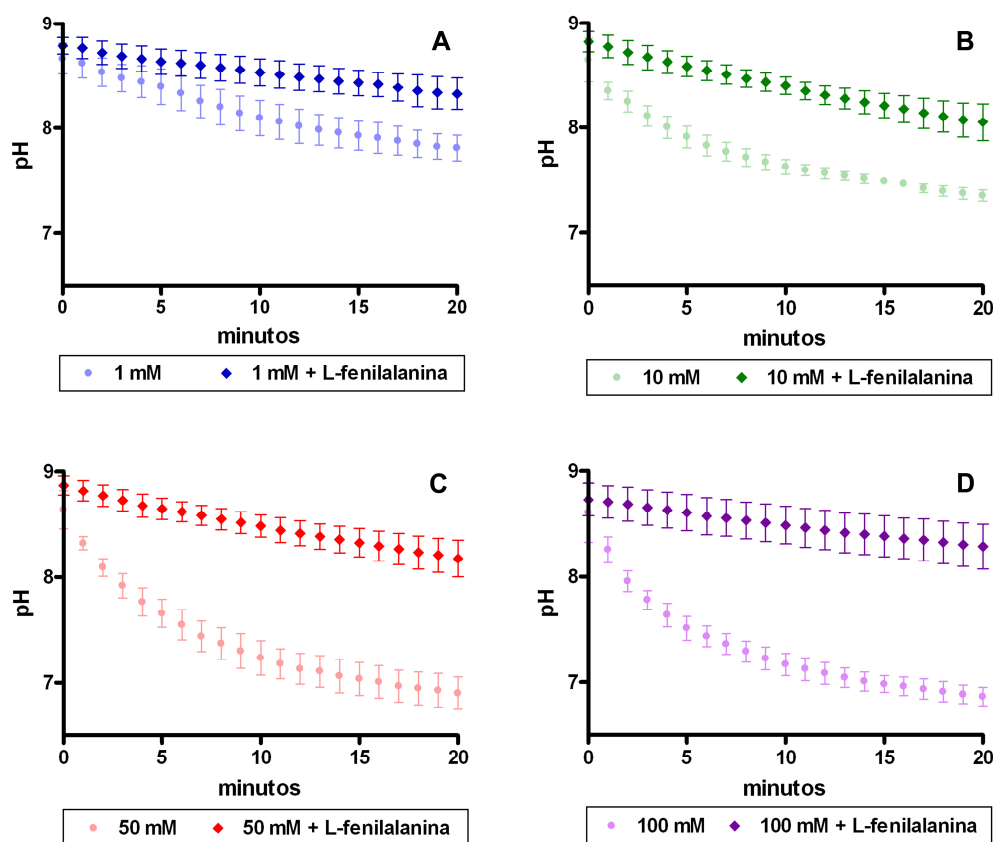


Ilustración 35. Efecto de diferentes concentraciones de Ca^{2+} sobre el pH luminal en experimentos de sacos duodenales evertidos en ausencia y presencia de L-fenilalanina. Cada panel representa con un tono más claro del color correspondiente a la concentración el pH obtenido en ausencia de L-fenilalanina mostrado en la Ilustración 32.

Al determinar el porcentaje de absorción de Ca^{2+} se observó un incremento del mismo para todas las concentraciones de Ca^{2+} lumbinales estudiadas comparando con los valores obtenidos en ausencia de L-fenilalanina (Ilustración 36).

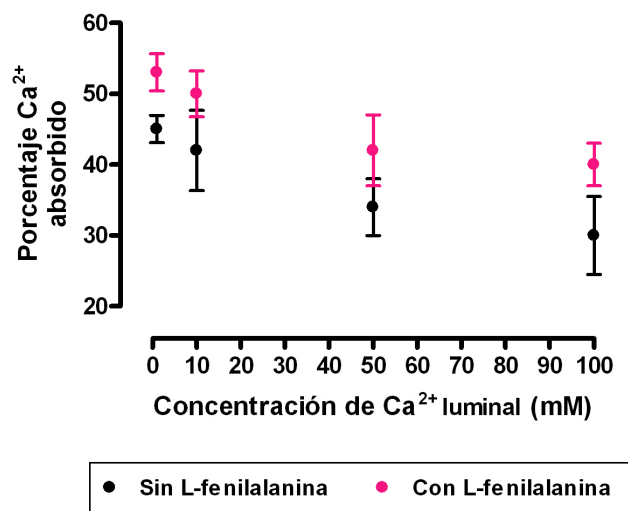


Ilustración 36 . Porcentaje de Ca^{2+} absorbido en función de la concentración de Ca^{2+} luminal en experimentos de sacos duodenales evertidos en ausencia y presencia de L-fenilalanina.

Conclusión parcial: La inhibición de la FAi produce un menor descenso del pH y una mayor fracción de absorción de Ca^{2+} .

6.8.4 MODIFICACIONES DE FOSFATO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO LUMINAL.

La concentración de fósforo total ^{IX} aumentó a lo largo del experimento en todas las concentraciones de Ca^{2+} investigadas, siendo mayor en los grupos 1 y 10 mM respecto de los grupos de 50 y 100 mM (Ilustración 37). Se esperaba que la concentración de fósforo total se incremente más en los grupos de mayor concentración de Ca^{2+} luminal debido a que en resultados previos ya mencionados se halló un aumento de la actividad de la FAi en membrana (6.7) y una mayor disminución del pH (6.8.1) a medida que se incrementó la concentración de Ca^{2+} luminal.

^{IX} Suma de todas las especies químicas derivadas del ácido fosfórico.

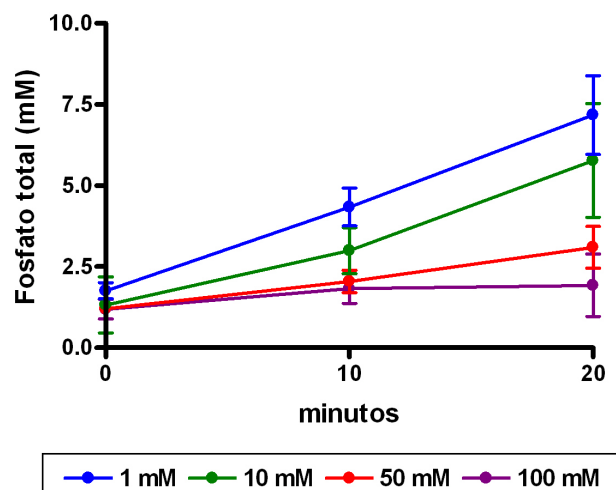


Ilustración 37. Fosfato total en la solución mucosa a lo largo del tiempo en experimentos de sacos duodenales evertidos.

Con estos datos y la concentración de Ca^{2+} luminal se calculó (Ver Apéndice 7.4) el porcentaje de Ca^{2+} que podría precipitar como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ para cada concentración de Ca^{2+} luminal al final del experimento (Ver Tabla 6). La probabilidad de precipitación en tiempos previos es inferior por la menos concentración de fosfato.

Tabla 6. Porcentaje de Ca^{2+} que precipita como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Ca^{2+} luminal	Porcentaje (%)
1	0.027 ± 0.011
10	0.00068 ± 0.00044
50	$1.96 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-5}$
100	$5.94 \times 10^{-6} \pm 2.27 \times 10^{-6}$

Conclusion parcial: Si bien en las condiciones experimentales el Ca^{2+} puede precipitar como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, el porcentaje del catión que se deriva hacia esta reacción es insignificante respecto del descenso del Ca^{2+} luminal. Por lo tanto, la disminución de la fracción de absorción no se debería a la precipitación de calcio como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

7 APÉNDICE

7.1 ACTIVIDAD DE FAI EN SOLUCIÓN

La actividad de FAi en solución se realiza midiendo el cambio de absorbancia a 405 nm, producido por la absorción de radiación por el p-nitrofenol (pNF), originado por hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que se utiliza como sustrato y carece de absorción a esa longitud de onda.

El valor de absorbancia obtenido a un dado tiempo es proporcional a la actividad de FAi en solución:

$$\text{Absorbancia} = E \cdot b \cdot \text{Actividad} \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde E es el coeficiente de extinción del p-NF y b el paso óptico de la cubeta.

A partir de la ecuación 1, se obtiene la actividad:

$$\text{Actividad} = \text{Absorbancia} / E \cdot b$$

El coeficiente de extinción se obtuvo en el laboratorio para las condiciones de trabajo (ver más adelante), siendo el valor utilizado a lo largo de este trabajo de tesis 279 unidades Abs.litro/cm.mmol pNFF.

Con este valor del coeficiente de extinción, 1 cm como paso óptico de la cubeta utilizada (cubeta de cuarzo, 0.5 ml para medidas de longitud de onda superiores a 200 nm, Sigma Co, St Louis, MO, USA) y la variación de absorbancia por segundo se obtiene la actividad de FAi en solución:

$$\text{Actividad} = \text{unidades de absorbancia} \cdot \text{s}^{-1} / E \cdot b$$

Reemplazando las unidades de E y b en la ecuación anterior resulta:

$$\text{Actividad} = \text{unidad de absorbancia} \cdot \text{s}^{-1} / \text{unidad de abs.litro} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}$$

Simplificando, se obtiene la unidad de medición de la actividad de FAi:

$$\text{Actividad} = \text{mmol pNFF} / \text{s.litro}$$

Cálculo del coeficiente extinción del pNF

Se realizó utilizando una solución de p-nitrofenol 10 mM en dietanolamina 1 M (DEA).

La determinación se llevó a cabo a la temperatura que se realizaron todas las mediciones de esta tesis, con la misma cubeta y en el espectrofotómetro que se utilizó a lo largo de todos los experimentos (Ver detalles en materiales y métodos).

Se ajustó a 0 de absorbancia con buffer DEA a 405 nm. Luego se colocó una solución 10 mM de pNF y se midió su absorbancia.

Aplicando la ecuación: $Absorbancia = E \cdot b \cdot c$ (ecuación 2)

Utilizando $b = 1$ cm, A: valor medido de la solución 10 mM de pNF y $c = 10$ mM (concentración de la solución de pNF utilizada), se determinó el coeficiente de extinción por cuadruplicado utilizando la ecuación 2, el cual fue de 279 ± 4 (media \pm SD).

7.2 CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} EN PRESENCIA DE EGTA

El EGTA es un quelante de cationes divalentes, con afinidad diferente por ellos. En este apéndice se discute el efecto del EGTA sobre la concentración de Ca^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} libre luego de la adición de EGTA a una solución. La Tabla 7 muestra las constantes de disociación (K) y sus pK para los iones mencionados.

Tabla 7. Constantes de disociación (K) y pK para los iones en estudio.

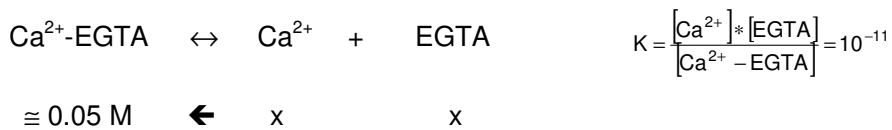
	K	pK
Ca^{2+}	1×10^{-11}	11.0
Mg^{2+}	6.3×10^{-6}	5.2
Zn^{2+}	1.26×10^{-13}	12.9

Las soluciones utilizadas en experimentos con FAi purificada *in vivo* (Ver 6.6) tuvieron concentraciones de Ca^{2+} 0-100 mM y Mg^{2+} 1 mM. En los experimentos donde se utilizó el EGTA, el Ca^{2+} alcanzó una concentración de 50 mM.

En los cálculos realizados en el siguiente análisis se utilizarán las concentraciones en mol/l (M) y se hallarán los valores teóricos de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} para los experimentos mencionados.

Análisis de las concentraciones de Mg^{2+} y Zn^{2+} luego de agregar EGTA a una solución de FAi tratada con Ca^{2+} 50 mM.

Al adicionar a una solución de Ca^{2+} 0.05 M, EGTA en concentración 0.05 M, el equilibrio de disociación del quelato Ca^{2+} -EGTA queda expresado con la siguiente ecuación química:



Dada la alta afinidad entre el Ca^{2+} y el quelante, se puede suponer que todo el catión y el quelante estarán en forma de complejo Ca^{2+} -EGTA, dejando concentraciones libres de Ca^{2+} y EGTA muy bajas (x).

Reemplazando estos valores en la constante de disociación

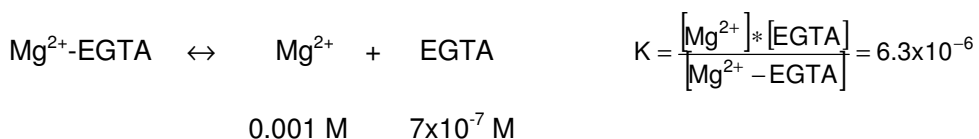
$$\frac{x * x}{0.05} = 10^{-11}$$

$$x = \sqrt{10^{-11} * 0.05} = 7 \times 10^{-7} \text{ M}$$

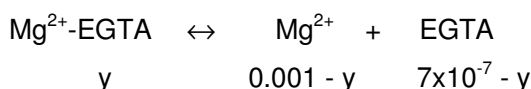
Por lo tanto en una solución 0.05 M de Ca^{2+} , la adición de EGTA en concentración 0.05 M produciría una concentración de Ca^{2+} libre de 7×10^{-7} M y el mismo valor para el EGTA libre.

¿Qué efecto tiene el EGTA sobre la concentración de Mg^{2+} ?

La siguiente ecuación representa el equilibrio de disociación del quelato Mg^{2+} -EGTA. Se considera que la concentración de Mg^{2+} libre es 0.001 M y la de EGTA 7×10^{-7} M, valor establecido más arriba.



Cantidades equimolares (y) de Mg^{2+} y EGTA se consumirán en la formación del quelato:



Reemplazando en la ecuación de la constante de disociación:

$$\frac{[0.001 - y] * [7 \times 10^{-7} - y]}{y} = 6.3 \times 10^{-6}$$

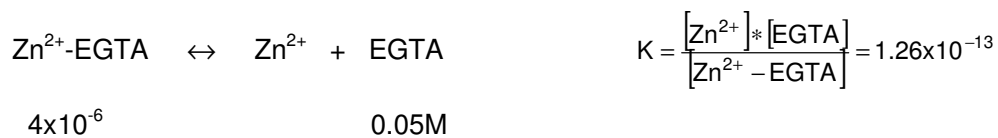
resolviendo la ecuación cuadrática resultante se obtiene el valor de 6.5×10^{-7} .

Por lo tanto la concentración de Mg^{2+} libre en la solución es:

$$Mg^{2+} = 0.001 - 6.5 \times 10^{-7} = 9.993 \times 10^{-4} \text{ M} \cong 1 \text{ mM}$$

que es la concentración analítica utilizada. Por lo tanto al agregar EGTA a una solución Ca^{2+} 50 mM y Mg^{2+} 1 mM, la concentración de este último no es afectada.

Por otra parte, el Zn^{2+} con EGTA forma un complejo cuya ecuación de disociación se puede escribir:



Se considera 4×10^{-6} M la concentración de Zn^{2+} considerando que las soluciones de FAi purificada contienen aproximadamente 1 μM de la enzima y la misma contiene 4 átomos de Zn^{2+} por molécula. Dada la alta afinidad del Zn^{2+} por el EGTA, si el Zn^{2+} es extraído de la estructura de la enzima se puede considerar que la totalidad de éste pasará a formar parte del complejo.

$$K = \frac{[Zn^{2+}] * 0.05}{4 \times 10^{-6}} = 1.26 \times 10^{-13}$$

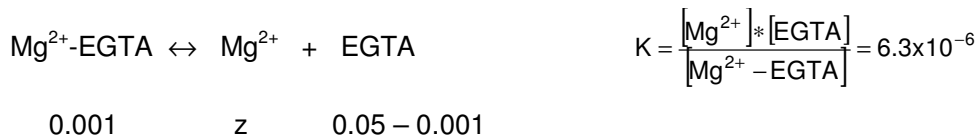
que arroja un valor para la concentración de Zn^{2+}

$$Zn^{2+} = 1 \times 10^{-17} \text{ M}$$

Análisis de las concentraciones de Mg^{2+} y Zn^{2+} luego de agregar EGTA a una solución de FAi, previo al tratamiento con Ca^{2+} 50 mM.

Los buffers utilizados en los experimentos con FAi tienen una concentración de Mg^{2+} de 0.001 M.

Al adicionar EGTA hasta una concentración analítica de 50 mM se puede suponer que todo el Mg^{2+} pasará a formar parte del quelato Mg^{2+} -EGTA y que la concentración de EGTA libre es la diferencia entre lo agregado y lo que pasa a formar parte del quelato. Como incógnita queda la concentración de Mg^{2+} .



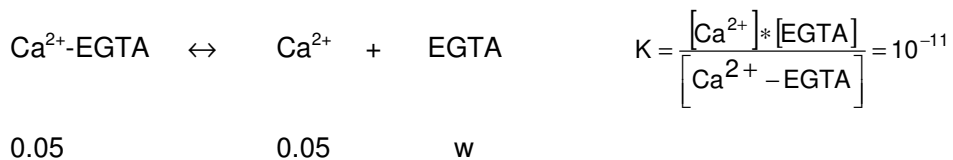
Reemplazando estos valores en la ecuación de la constante de disociación resulta:

$$K = \frac{z * 0.049}{0.001} = 6.3 \times 10^{-6}$$

por lo tanto la concentración de Mg^{2+} resulta igual a 1.29×10^{-7} M.

Al adicionar a esta solución Ca^{2+} hasta una concentración final de 0.1 M, la concentración de Ca^{2+} libre resultó de 0.05 M.

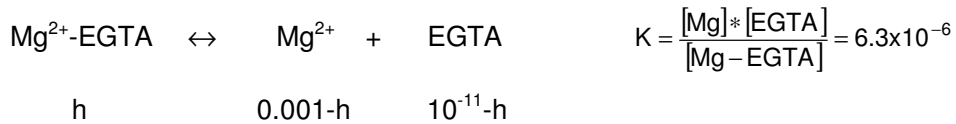
La mayor estabilidad del quelato Ca^{2+} -EGTA, consumirá todo el EGTA, pudiendo considerarse que la concentración del complejo es 0.05 M, ya que todo el EGTA agregado en principio fue ese valor. Dado que el Ca^{2+} fue agregado para lograr una concentración de Ca^{2+} libre de 0.05 M, la concentración libre puede obtenerse a partir de la ecuación de disociación del quelato:



Reemplazando estos valores en la ecuación de la constante de disociación resulta:

$$\frac{0.05 * w}{0.05} = 10^{-11}$$

de lo que se deduce que la concentración del EGTA será 10^{-11} M. Con esta concentración de EGTA libre y concentración analítica de Mg^{2+} de 0.001 M, se puede obtener la concentración de Mg^{2+} libre. Se puede suponer que la concentración del complejo Mg^{2+} -EGTA será 0.001 M, y que estará en equilibrio con el Mg^{2+} y el EGTA libre según la siguiente ecuación:



Reemplazando estos valores en la ecuación de la constante de disociación resulta:

$$\frac{(0.001-h) \cdot (10^{-11}-h)}{h} = 6.3 \times 10^{-6}$$

dado que h debe ser menor que 10^{-11} , el valor de h puede despreciarse respecto de 0.001, resultando:

$$\frac{(0.001) \cdot (10^{-11}-h)}{h} = 6.3 \times 10^{-6}$$

resolviendo resulta un valor de $h = 9.94 \times 10^{-12}$ M.

Por lo tanto:

$$[Mg^{2+}] = 0.001 - 9.94 \times 10^{-12} \cong 1 \text{ mM}$$

por lo tanto la concentración de Mg^{2+} en la solución luego del agregado de EGTA y Ca^{2+} resulta aproximadamente 1 mM, es decir, que no sería afectada su concentración.

7.3 EFECTO DE LA FAi Y EL Ca²⁺ SOBRE EL pH

Se realizaron experimentos exploratorios *in vitro* con FAi purificada para determinar si la acción de la enzima producía descenso del pH luminal, lo cual podría tener efecto sobre la actividad del transportador de Ca²⁺ TRPV6, el cual es inhibido por valores bajos de pH [69].

En la Ilustración 38 se puede observar que cuando se colocó el sustrato de FAi sin enzima el pH descendió levemente a lo largo del tiempo producto del contacto con el aire y la disolución del CO₂ (decaimiento exponencial de una fase, $k = 0.00023 \pm 0.00003$). Al agregar FAi purificada, se observa claramente un descenso del pH dependiente de la cantidad de enzima colocada (3 μg , $k = 0.00066 \pm 0.00002$; 15 μg , $k = 0.00150 \pm 0.00007$).

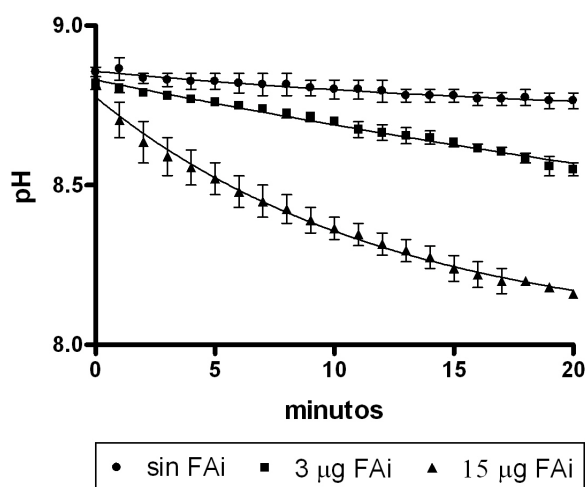


Ilustración 38. Efecto de la concentración de FAi purificada sobre el pH.

Para realizar la comparación entre los grupos se seleccionaron valores cada 5 minutos (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de la concentración de FAi purificada sobre el pH.

Minutos	Sin FAi	3 μg FAi	15 μg FAi
0	8.85 \pm 0.021	8.82 \pm 0.028	8.84 \pm 0.028
5	8.82 \pm 0.035	8.76 \pm 0.014 ^a	8.52 \pm 0.071 ^{a b}
10	8.80 \pm 0.042	8.70 \pm 0.014 ^a	8.36 \pm 0.049 ^{a b}
15	8.78 \pm 0.028	8.63 \pm 0.021 ^a	8.24 \pm 0.055 ^{a b}
20	8.76 \pm 0.035	8.55 \pm 0.028 ^a	8.16 \pm 0.010 ^{a b}

^a Representa diferencia significativa respecto del grupo sin FAi

^b Representa diferencia significativa respecto del grupo con 3 μg FAi

La Ilustración 39 demuestra que la disminución del pH es dependiente de la presencia de sustrato de la FAi, presentando mayor afinidad sobre el pNFF que sobre el β -glicerofosfato coincidentemente con la literatura. Se describe en intestino una actividad de FAi con pNFF entre 2-4 veces mayor que en presencia de β -glicerofosfato [49]. Sin embargo, es importante remarcar que cuando estos experimentos preliminares se realizaron empleando sacos duodenales evertidos, el descenso de pH se produjo ante la ausencia de sustratos exógenos, por lo que se considera que la FAi actuaría sobre sustratos endógenos, probablemente de la membrana del enterocito, fenómeno que no fue estudiado en esta tesis.

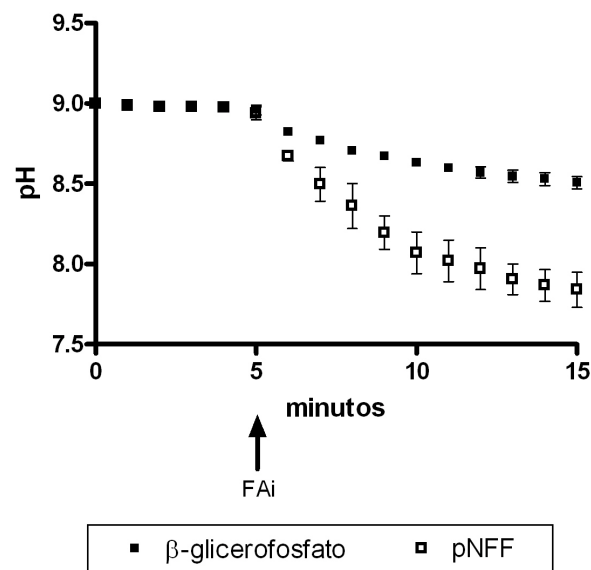


Ilustración 39. Efecto del tipo de sustrato sobre el pH con FAi purificada.

Para confirmar que el efecto del pH hallado es debido a la acción de la FAi se realizaron experimentos con FAi purificada y con sacos evertidos duodenales en presencia de L-fenilalanina 16 mM, inhibidor de la enzima.

La Ilustración 40 no muestra cambios del pH en ausencia de FAi (negro). Al colocar al minuto 5 la FAi purificada se observa un claro descenso del pH (azul), el cual fue prácticamente abolido cuando la FAi se colocó en presencia de L-fenilalanina (rojo).

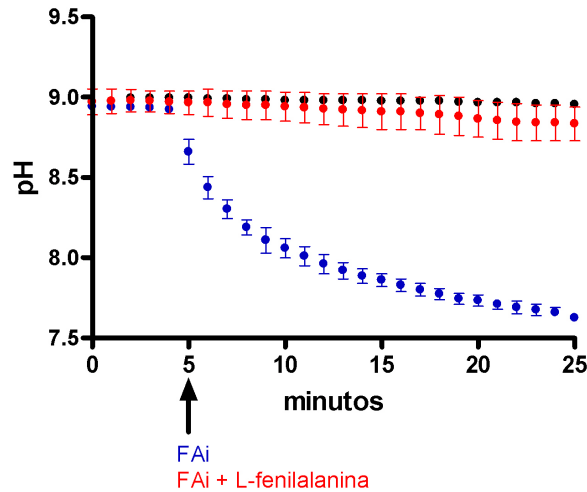


Ilustración 40. Efecto de la inhibición de FAi purificada por L-fenilalanina sobre el pH luminal.

Por su parte, en la Ilustración 41 se observa el cambio de pH de la solución utilizando enzima purificada (rojo) y sacos duodenales evertidos (azul) luego del agregado de L-fenilalanina.

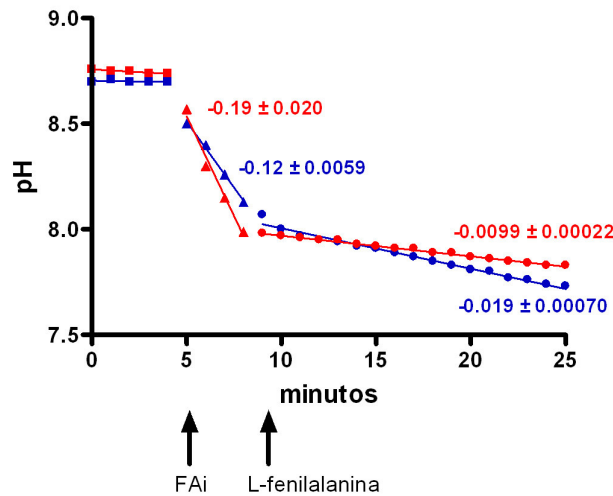


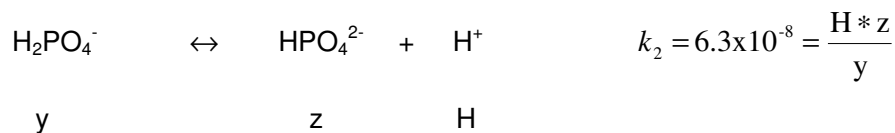
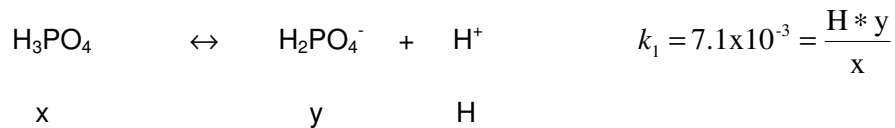
Ilustración 41. Efecto de la L-fenilalanina sobre el pH luminal por inhibición de la FAi purificada (rojo) y la FAi anclada a membrana (azul) en experimentos de sacos duodenales evertidos. Para mayor claridad de los resultados se omitieron los desvíos standard. Los valores de la gráfica indican las pendientes de las respectivas regresiones lineales.

Conclusión parcial: Estos experimentos preliminares permiten confirmar que el descenso del pH observado en función de la concentración de Ca^{2+} es debido a la acción de la FAi.

7.4 ESTIMACIÓN DEL CALCIO QUE PRECIPITA COMO FOSFATO DE CALCIO

El desarrollo que se plantea a continuación permite analizar teóricamente la posibilidad de precipitación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a partir de las soluciones utilizadas en experimentos de sacos duodenales evertidos a partir de concentraciones reales halladas (Ver 6.8.4) y las constantes de producto de solubilidad de la sal .

El ácido fosfórico es un ácido poliprótico con 3 equilibrios de disociación cuyas reacciones se plantean a continuación:



donde k_1 , k_2 y k_3 son las constantes de disociación del H_3PO_4 , H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} [127].

Por otra parte x , y , z y w son las concentraciones molares de H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} respectivamente.

Por su parte, H representa la concentración de protones en la solución.

La concentración de fofato total determinada espectrofotométricamente (a) puede plantearse como la suma de las cuatro formas químicas originadas del ácido fosfórico:

$$a = x + y + z + w \quad (\text{ecuación 1})$$

A continuación se detallan los cálculos para hallar la concentración de PO_4^{3-} (w):

Se obtiene z a partir de k_3 :

$$k_3 = \frac{\text{H} * w}{z} \rightarrow z = \frac{\text{H} * w}{k_3} = z = \frac{w\text{H}}{k_3} \quad (\text{ecuación 2})$$

Se obtiene y de k_2 reemplazando z por la ecuación 2:

$$k_2 = \frac{H * z}{y} \rightarrow y = \frac{H * z}{k_2} = y = \frac{wH^2}{k_2 k_3} \quad (\text{ecuación 3})$$

Se obtiene x de k_1 reemplazando y por la ecuación 3:

$$k_1 = \frac{H * y}{x} \rightarrow x = \frac{H * y}{k_1} = x = \frac{wH^3}{k_1 k_2 k_3} \quad (\text{ecuación 4})$$

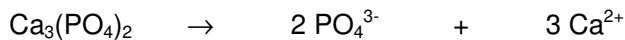
Reemplazando las ecuaciones 2, 3 y 4 en la ecuación 1, resulta:

$$a = \frac{wH^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{wH^2}{k_2 k_3} + \frac{wH}{k_3} + w \rightarrow a = w * \left[\frac{H^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{H^2}{k_2 k_3} + \frac{H}{k_3} \right]$$

A partir de la cual se obtiene w:

$$w = \frac{a}{\left[\frac{H^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{H^2}{k_2 k_3} + \frac{H}{k_3} \right]} \quad (\text{ecuación 5})$$

La disolución de la precipitación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se puede escribir:



cuya constante de producto de solubilidad (ksp) es 2×10^{-33} [127].

$$k_{sp} = [\text{Ca}^{2+}]^3 * [\text{PO}_4^{3-}]^2$$

donde $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{PO}_4^{3-}]$ son las concentraciones que se alcanzan en estado de equilibrio.

Al inicio del experimento la concentración de PO_4^{3-} es igual a cero. A medida que transcurre el tiempo la concentración de PO_4^{3-} y protones se modifica. La concentración de protones (H^+) se calculó a partir del pH medido mientras que la concentración PO_4^{3-} (w) se obtuvo empleando la ecuación 5 y la concentración de fosfato total medida espectrofotométricamente (a).

La Tabla 9 muestra estos valores a los 20 minutos de experimentación para las diferentes concentraciones de Ca^{2+} luminal investigada.

Tabla 9. Concentración de fósforo total (a), protones (H^+), fosfato (w) y calcio (Ca^{2+}) en la solución mucosa en experimentos de sacos duodenales evertidos.

Ca^{2+} (mM)	a (M)	pH	H^+	w	Ca^{2+} medido (M)
1	0.007±0.002	7.81±0.12	1.59x10 ⁻⁸ ±3.84x10 ⁻⁹	1.83x10 ⁻⁷ ±7.46x10 ⁻⁸	0.00055±0.0001
10	0.006±0.003	7.35±0.05	4.44x10 ⁻⁸ ±5.37x10 ⁻⁹	3.63x10 ⁻⁸ ±2.16x10 ⁻⁸	0.0058±0.001
50	0.003±0.001	6.90±0.15	1.32x10 ⁻⁷ ±4.24x10 ⁻⁸	3.65x10 ⁻⁹ ±6.06x10 ⁻¹⁰	0.0325±0.008
100	0.002±0.0007	6.86±0.09	1.39x10 ⁻⁷ ±2.83x10 ⁻⁸	2.20x10 ⁻⁹ ±9.52x10 ⁻¹⁰	0.071±0.011

Con el valor de la concentración de Ca^{2+} medido en el experimento y la concentración de PO_4^{3-} calculada (w) se obtuvo el valor de la constante de reacción (Q).

$$Q = [\text{Ca}^{2+}]^3 * [\text{PO}_4^{3-}]^2$$

donde $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{PO}_4^{3-}]$ son las concentraciones determinadas experimentalmente.

Si Q es mayor que ksp se produce precipitación como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Tabla 10. Cociente de reacción (Q) y constante de producto de solubilidad (ksp).

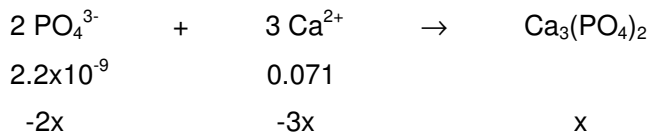
Ca^{2+} (mM)	Q	ksp
1	5.58x10 ⁻²⁴ ±4.53x10 ⁻²⁴	2x10 ⁻³³
10	2.57x10 ⁻²² ±3.08x10 ⁻²²	2x10 ⁻³³
50	4.58x10 ⁻²² ±1.64x10 ⁻²²	2x10 ⁻³³
100	1.74x10 ⁻²¹ ±1.31x10 ⁻²¹	2x10 ⁻³³

Como se desprende la comparación de Q con ksp (Tabla 10) el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tiene condiciones propicias para precipitar, proceso que disminuiría la absorción de Ca^{2+} .

El cálculo siguiente realizado como ejemplo para la concentración luminal de Ca^{2+} de 100 mM permite estimar el porcentaje de Ca^{2+} luminal que sería derivado hacia el proceso de precipitación.

La ecuación siguiente muestra la precipitación de Ca^{2+} como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ con las concentraciones de PO_4^{3-} calculada (w) y Ca^{2+} medido a los 20 minutos de

experimentación. Dado que las condiciones de precipitación son propicias, precipitaría como máximo una cantidad "x" consumiendo 2x y 3x de PO_4^{3-} y Ca^{2+} respectivamente.



Se debe cumplir simultáneamente

$$\begin{cases}
 2.2 \times 10^{-9} - 2x \geq 0 \\
 0.071 - 3x \geq 0
 \end{cases}$$

Cuya solución es: $x \leq 1.1 \times 10^{-9}$

Este resultado indica que del 100% del Ca^{2+} luminal colocado (0.1 M), 71% aproximadamente permanece en la luz intestinal a los 20 minutos de experimentación, 29% aproximadamente se habrían absorbido y solo $3.3 \times 10^{-6}\%$ se estaría consumiendo para formar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Para las demás concentraciones y tiempos de experimentación se realizaron los mismos cálculos y los porcentajes de Ca^{2+} que precipitarían como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ son igualmente despreciables.

7.5 MODIFICACIONES DEL PATRÓN DE LIBERACIÓN DE FAI

Con las muestras obtenidas de los experimentos de sacos duodenales evertidos se analizó por Western blot (Ver 5.15) si la presencia de Ca^{2+} en la luz intestinal modificaba la secreción bidireccional de FAi [50]. En la Ilustración 42 se observa que a medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} luminal, se produjo menor liberación de la enzima hacia la solución mucosa a lo largo del tiempo (ANOVA, Test de tendencia lineal, $p < 0.05$). Esto se corresponde con una mayor cantidad de FAi en el compartimiento seroso al finalizar el experimento (Ilustración 43) (ANOVA, post test de Bonferroni, $p < 0.05$).

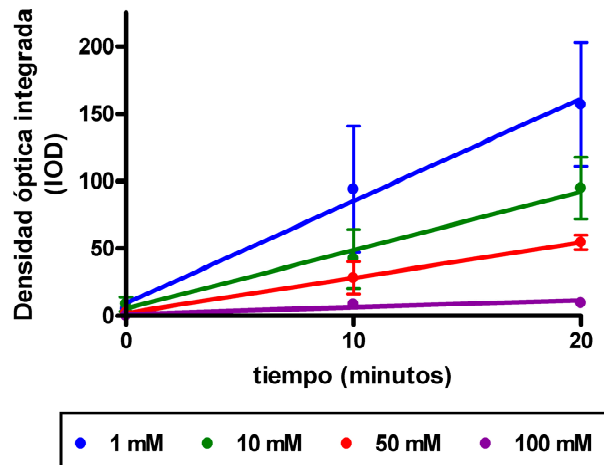


Ilustración 42. Western blot de FAi en la solución mucosa a lo largo del tiempo en experimentos de sacos duodenales evertidos.

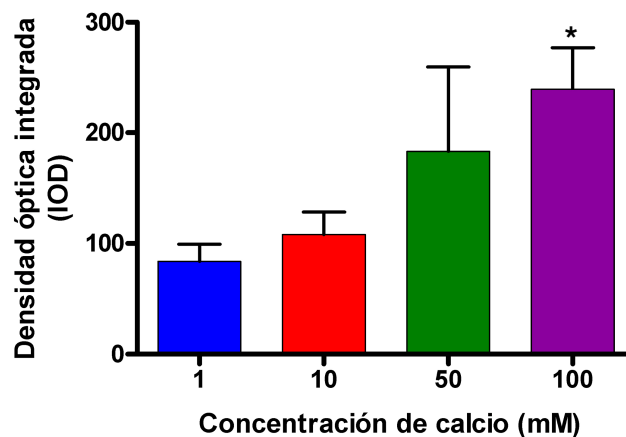


Ilustración 43. Western blot de FAi en la solución serosa al finalizar el experimento (20 min) de sacos duodenales evertidos. * indica diferencias significativas respecto de 1 y 10 mM.

Si bien se desconoce el rol que cumpliría esta modificación en la direccionalidad de liberación de la FAi desde el enterocito, esto es una prueba adicional de la interacción de la FAi con el Ca^{2+} . Este fenómeno será estudiado en proyectos posteriores.

8 DISCUSIÓN

8.1 FAi

La FAi se localiza en la membrana apical de los enterocitos. Por su localización y la co-expresión con otras proteínas involucradas en el transporte de Ca^{2+} se sospecha su participación en el mecanismo de absorción de este catión. La ubicación del sitio de captación de Ca^{2+} y el sitio de mayor actividad de FAi son idénticos [128], y al estimular con vitamina D, aumentó a las 4 horas la expresión de calbindina D_{9k} en la base vellositaria y las 8 horas en todas las fracciones. Simultáneamente a las 8 horas aumentó la actividad de FAi, en forma más marcada en la punta vellositaria. La absorción de Ca^{2+} aumentó a las 2 horas en la punta vellositaria [48]. Trabajos poco concluyentes hallaron correlación entre el transporte de Ca^{2+} y la actividad de FAi *in vivo* e *in vitro* [129,130,131,132].

Dos formas de FAi han sido purificadas por electroforesis del intestino humano, una de 140 kDa de peso molecular y otra de 168 kDa, siendo las subunidades constituyentes de 68 kDa y 80 kDa respectivamente [133]. Se ha demostrado la presencia de dos ARNm diferentes que codifican la FAi en la rata [53,134], hallándose en estudio las diferencias en la estructura de estas dos isoenzimas [24]. Además hay modificaciones postraduccionales que explicarían la heterogeneidad de la enzima así como sus modificaciones tanto en la actividad como en su peso molecular.

En estado postprandial se ha descrito un aumento de la actividad de FAi en plasma, utilizando anticuerpos anti-FAi [135]. Esta es una fuerte evidencia que la FAi estaría relacionada a la absorción de nutrientes.

8.2 FAI Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS

Si bien la FAi es una enzima de membrana del enterocito, se la encuentra en plasma en forma soluble. La colecistoquinina aumenta la actividad de FAi en la luz del intestino, mientras que el betanecol ^x aumenta la secreción de FAi hacia el plasma. Si bien la ingesta de grasa no tiene efecto sobre la actividad de la FAi en la parte distal del intestino [136], la grasa induce 7 horas después de su ingestión, la actividad de la FA soluble en

^x Droga parasimpaticomimética que actúa como un agonista selectivo de los receptores muscarínicos del sistema nervioso parasimpático.

plasma así como la actividad de la FA unida a las partículas que se describen en la luz de la porción proximal del intestino.

Trabajos realizados con línea celular con comportamiento similar a células intestinal (Caco-2), demostraron que la FAi es secretada tanto hacia el lumen como hacia el plasma [50].

8.3 FAi Y CALCIO

En este trabajo de tesis se estudió la interacción del Ca^{2+} con la FAi, pudiendo dicha interacción regular el pasaje de Ca^{2+} a nivel de la membrana apical del enterocito. *In vitro* con FAi purificada, el Ca^{2+} produce modificaciones de actividad y cambios en el peso molecular de la enzima. El efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de la FAi es bifásico sobre la enzima soluble sin embargo resultó ser estimulador sobre la enzima anclada a medida que se incrementó la concentración de Ca^{2+} en la luz intestinal. Se postula que el Ca^{2+} al estimular FAi, produciría un descenso del pH el cual inhibe la entrada de Ca^{2+} por el canal apical TRPV6.

El transporte de Ca^{2+} ha sido estudiado extensamente y se han descrito varios cationes (Cd^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) que inhiben el pasaje de Ca^{2+} a nivel apical [69]. Coincidentemente, se ha descrito la inhibición de FAi purificada de ternero por paladio que se asocia con un aumento de la masa molecular. Los datos sugieren que el paladio interactuaría negativamente en el mantenimiento de la integridad estructural y del rol catalítico [137].

La interacción entre Ca^{2+} y FA ha sido descrita por otros autores. El Ca^{2+} se une a una fosfatasa alcalina de 52-kDa del cartílago, previo y durante el proceso de calcificación [138]. Esta interacción ha sido demostrada con enzima purificada del omóplato de bovinos [55], hallándose que la proteína liga 25 iones Ca^{2+} por mol de proteína, con una constante de disociación de 0.31 $\mu\text{moles/L}$. Sin embargo en este trabajo no se evaluó el efecto sobre la estructura y la función hidrolítica de la enzima.

Trabajos realizados con FAi purificada y solubilizada con detergentes a partir de las microvellosidades duodenales demostraron que el Ca^{2+} inhibe a la enzima en concentraciones 0 a 10 mM [56]. En este trabajo de tesis se demuestra por dos métodos que con la enzima purificada a esas mismas concentraciones la FAi es estimulada por el Ca^{2+} , existiendo fijación del catión en sitios independientes y de igual afinidad. Sin

embargo a concentraciones mayores a 20 mM la enzima es inhibida por el Ca^{2+} de una manera no competitiva y acompañada de aumento en la masa molecular. Estos hallazgos son fundamentados por experimentos realizados por PAGE, Western blot y filtración en gel [126].

Con respecto al efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de la FAi, los resultados son contradictorios al revisar trabajos previos que relacionan actividad de FAi con presencia de Ca^{2+} . Mientras que Birge SJ et al [54] encontraron que la actividad de la FAi decrece como función de la concentración de Ca^{2+} en un rango 1-10 mM, Deliconstantinos G et al [56] hallaron un aumento en la actividad en función de la concentración del catión. Sin embargo en estos trabajos el mecanismo inhibitorio o estimulador no ha sido estudiado, como tampoco se especifica el grado de pureza de las muestras utilizadas. En los experimentos descritos en esta tesis la pureza de la FAi fue demostrada por PAGE y Western blot, donde una única banda a masa molecular de 168 ± 6 kDa fue demostrada al final de la purificación. Dos deducciones pueden hacerse, en primer lugar la forma agregada sería un homopolímero y en segundo lugar la formación del homopolímero puede producirse sin la adición de Ca^{2+} , aunque la presencia de altas concentraciones del catión aumenta la magnitud de este proceso. En otros trabajos se ha demostrado la presencia de bandas similares a las descritas en esta tesis. En ausencia de SDS se han observado bandas de 140 kDa y 443 kDa, y de 60 kDa en presencia de SDS [139]. Sin embargo en estos trabajos las bandas se detectaron por tinción del gel y no con anticuerpo anti-FAi y no se menciona la presencia de Ca^{2+} .

En esta tesis también se ha demostrado un efecto bifásico del Ca^{2+} sobre la enzima purificada. Sin embargo este efecto estimulador a concentraciones de 0-10 mM e inhibitorio a concentraciones de Ca^{2+} 20-100 mM es variable y no siempre la enzima ha mostrado la misma sensibilidad a la presencia de Ca^{2+} . Otros factores desconocidos podrían interactuar con el Ca^{2+} e influir sobre la sensibilidad de la FAi al Ca^{2+} . Planteamos que el estado de ayuno, la cantidad de Ca^{2+} de la dieta y la edad de la rata, entre otros, podrían estar involucrados en la respuesta de la FAi al Ca^{2+} .

También se demostró que el Ca^{2+} produce aumento del punto isoeléctrico de la FAi. Esta modificación del pI confirma la unión de Ca^{2+} a la FAi descrita a través de los experimentos de fijación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, y también indica que la unión probablemente no es llevada a cabo a través de fuerzas electrostáticas, ya que de ser así la migración en un gradiente de pH, hasta el punto de carga neta cero, provocaría liberación del Ca^{2+} . En otros trabajos, la FAi fue separada en regiones del gradiente de pH, cada una compuesta por 3 o 4 bandas. La forma con migración más cercana al ánodo tuvo un pI 4.65-4.73,

mientras que para la otra forma se obtuvo un pI de 4.85-4.95. Esta última no fue siempre visible en los isoelectroenfoco de FAi [140]. Un aspecto a tener en cuenta es que en estos trabajos no se detalla la concentración de Ca^{2+} de las soluciones utilizadas.

Los experimentos de electroforesis bidimensional indican que simultáneamente con el aumento del pI de la FAi se observa un aumento de la forma agregada. Sin embargo, ambas formas en presencia de Ca^{2+} tienen el mismo pI, hecho que estaría indicando que la unión a Ca^{2+} no produce importantes modificaciones de la estructura de la proteína, en lo que se refiere a modificaciones de la proporción de aminoácidos básicos y ácidos. La unión a Ca^{2+} no permite la observación de otras bandas de migración en electroforesis en geles de PAGE, lo cual estaría indicando que no existirían procesos hidrolíticos que eliminen péptidos de la FAi. El mismo pI para “agregado molecular” y FAi, en presencia de Ca^{2+} , adiciona evidencia que los agregados serían homopómeros. Esta hipótesis es también sostenida por el hecho que los experimentos que condujeron a esta conclusión fueron llevados a cabo con FAi purificada a homogeneidad demostrada por PAGE y Western blot.

El revelado de Western blot de FAi tratada con EGTA luego de la exposición a Ca^{2+} 50 mM demuestra que el proceso de agregación es reversible. Pero no sólo produce la reconversión de la forma “agregado molecular” a FAi sino también produce un incremento predominante del “monómero”. Como se muestra en el Apéndice 7.2, el tratamiento con EGTA produce la quelación del Ca^{2+} y el Zn^{2+} , dejando concentraciones muy bajas de Ca^{2+} e insignificantes concentraciones de Zn^{2+} . Sin embargo la concentración de Mg^{2+} no sería modificada. Luego del tratamiento con EGTA no se recupera la actividad de FAi, lo cual permite hipotetizar que el Ca^{2+} desplazaría al Mg^{2+} y/o el Zn^{2+} en la estructura dimérica. Desde otro punto de vista, dado que la concentración de “monómero” aumenta luego del tratamiento de Ca^{2+} y EGTA pero no luego del tratamiento con EGTA solamente, se puede deducir que no es el EGTA el causante del desdoblamiento en “monómero” sino que es el Ca^{2+} sería el responsable del fenómeno, posiblemente por desplazamiento de algunos de los dos iones mencionados.

El tratamiento con EGTA previo a la adición de Ca^{2+} decrece la actividad de FAi a valores casi indetectables, probablemente por la quelación del Zn^{2+} y parte del Mg^{2+} presente en la enzima, según puede deducirse del análisis de las concentraciones utilizadas y las constantes de inestabilidad de los complejos EGTA-catión (Apéndice 7.2). Cuando el Ca^{2+} es adicionado a la solución, la estabilidad del complejo y la elevada concentración de Ca^{2+} podría liberar el Mg^{2+} complejado por el EGTA, efecto que tendría protagonismo en la recuperación de la actividad de la enzima y la presentación del efecto bifásico

inducido por el Ca^{2+} . Dado que la estabilidad del quelato Ca^{2+} -EGTA es menor que la del quelato Zn^{2+} -EGTA (constante de estabilidad 1.26×10^{-13} M), la adición de Ca^{2+} a la solución no sería suficiente para liberar el Zn^{2+} del complejo. Puede hipotetizarse entonces que el agregado del EGTA no complejaría el Zn^{2+} . En otros trabajos ha sido demostrado que la quelación del Zn^{2+} y su eliminación de la enzima se puede lograr si el tratamiento se hace en presencia de sustratos de la FAi, indicando que el Zn^{2+} de alguna manera estaría involucrado en la interacción FAi-sustrato [141].

8.4 Ca²⁺ Y MEMBRANA

Las membranas celulares ligan Ca^{2+} con alta afinidad. El transporte vesicular de Ca^{2+} sería sostenido en parte por la unión de Ca^{2+} a las membranas y su transporte a través de vesículas. Algunos trabajos sostienen la hipótesis que la mayor cantidad de Ca^{2+} se transportaría a través de vesículas formadas en las microvellosidades duodenales [142]. La unión de Ca^{2+} a la FAi, descrita en este trabajo de tesis y la demostración de la presencia de FAi en estado postprandial en el plasma, podrían ser eventos sucesivos de un proceso de transporte de Ca^{2+} a nivel intestinal.

El transporte a través de las membranas depende en parte de la fluidez de las mismas [143]. Se ha demostrado que el Ca^{2+} modifica las propiedades fisicoquímicas de las membranas [56] de las microvellosidades intestinales de la rata. En estos trabajos se demostró una disminución de la fluidez y un cambio en la energía de activación de las reacciones de hidrólisis catalizadas por la FAi. Los resultados se correlacionaron con una disminución de la actividad en el rango de concentraciones de Ca^{2+} de 0-10 mM. Estos trabajos fueron realizados *in vitro* con enzima purificada y con vesículas solubilizadas e implicarían una disminución de la velocidad de reacción catalizada por la FAi en presencia de Ca^{2+} .

En los trabajos *in vitro* e *in vivo* realizados en esta tesis se describen, tanto con enzima purificada como con enzima ligada a membrana, que a concentraciones de Ca^{2+} 0-10 mM la actividad de la FAi es estimulada por la presencia de Ca^{2+} .

La forma de unión existente entre la FAi y la membrana apical del enterocito descrita previamente contribuye a reforzar el hecho de que la FAi se estimula en función de la concentración de calcio luminal a concentraciones altas del catión, hecho que difiere de lo observado *in vitro* con la enzima soluble. Esto podría deberse a la diferente situación en la que se encuentran las enzimas en los experimentos mencionados. En los experimentos *in vivo*, al hallarse anclada a la membrana y dentro del microambiente otorgado por la membrana plasmática y el glicocálix, la FAi no tendría la posibilidad de

agregación molecular. Contrariamente, en los experimentos *in vitro* los pasos de purificación desplazan a la FAi de dicho microambiente. Experimentos donde se pudieran mantener las condiciones mencionadas no son posibles por la falta de tecnología adecuada.

8.5 FAi *IN VIVO*

Cuando la enzima se encuentra unida a la membrana de las microvellosidades el efecto del Ca^{2+} no es el mismo que con la enzima purificada soluble. Experimentos realizados con intestino aislado *in situ* demostraron que el Ca^{2+} estimula la actividad de la enzima ligada a membrana en todo el rango de concentraciones investigadas (1-100 mM) ^{XI}. Como era de esperar por la duración de los experimentos, las medidas inmunohistoquímicas de la enzima demuestran que no hay cambios en la expresión de la proteína.

Dado que en experimentos *in vivo*, como los descritos, los procesos de transporte están activos, podría sospecharse que la concentración de Ca^{2+} sobre la membrana no sea idéntica a la hallada en el seno de la solución. La quelación con EGTA del Ca^{2+} a cortes histológicos de duodenos de ratas normales y la posterior exposición a concentraciones precisas de Ca^{2+} sería prueba a favor que el Ca^{2+} tiene un único efecto estimulador sobre la enzima anclada, a diferencia del efecto bifásico observado en solución con la enzima purificada.

Los resultados hallados en esta tesis parecen ser opuestos a los hallados por otros investigadores [144]. Fournier et al, describe en ratas que tienen alta absorción de Ca^{2+} , un importante aumento de la actividad de FAi en el íleon, sin el aumento de otras enzimas de las microvellosidades, como son la maltasa, invertasa y leucilaminopeptidasa. El estrés oxidativo puede alterar el transporte de Ca^{2+} a nivel intestinal [97]. Al parecer el estrés oxidativo modificaría la acción de enzimas de membrana como son la FAi y la Ca^{2+} -ATPasa.

El transporte de Ca^{2+} parece estar asociado al transporte de azúcares y a su fosforilación, con fosfatos proveniente de la hidrólisis de ésteres por parte de la FAi. La inhibición de FAi por Pi decrece la absorción de Ca^{2+} . La floridzina, inhibidor del transporte de glúcidos inhibe parcialmente el transporte de Ca^{2+} [145]. El fosfato, inhibidor de FAi, inhibe tanto el

^{XI} El rango de concentraciones estudiadas fueron seleccionadas tomando como modelo el trabajo de Bronner, J Cel Biochem 2003 [62] y en función de la ingesta de calcio de las ratas como se detalla a continuación. Considerando que un rata adulta ingiere 21 gramos de alimento (dieta normocálcica entre 0.9-1.2 g%) y bebe 24 ml de agua y suponiendo ingesta de agua y alimento y disolución simultánea, podría esperarse una concentración de calcio máxima entre 193-258 mM. Si bien estos valores son mayores a los estudiados

transporte dependiente como el independiente de glúcidos. Sin embargo la L-fenilalanina no inhibe ninguno de los dos tipos de transporte.

Es conocido que el descenso del pH modifica la actividad del canal de Ca^{2+} TRPV6 [69], así como que el transporte activo transcelular de Ca^{2+} es inhibido por la acidificación del medio apical en cultivos primarios de células CNT y CCD de conejo [146].

La FAi hidroliza ésteres monofosfóricos y produce un descenso del pH de la solución. La presencia de componentes del glicocálix con carga negativa permite suponer una función como buffer o regulador de pH, por lo cual las variaciones observadas en los experimentos de sacos evertidos duodenales podrían verse influenciadas por la misma. Sin embargo en nuestras condiciones experimentales la estructura del glicocálix no fue modificada por lo cual si bien existe la posibilidad de participar como buffer, la misma es idéntica en todos los grupos siendo la diferencia de pH observada dependiente de la concentración de calcio luminal.

En esta tesis se estudió la asociación entre Ca^{2+} , actividad de FAi, pH luminal y transporte de Ca^{2+} . Estos estudios se realizaron con dos modelos experimentales: intestino aislado *in situ* y sacos duodenales evertidos. Si bien el segundo modelo está más alejado de las condiciones fisiológicas que el primero, fue necesario utilizarlo como complemento, ya que ofrece la posibilidad de llevar a cabo mediciones del pH del espacio luminal y determinar las concentraciones de Ca^{2+} del espacio luminal y seroso con mayor precisión que el intestino aislado *in situ*. Contrariamente, la manipulación y preparación de los sacos duodenales evertidos hacen que los cortes histológicos no sean de la calidad necesaria para realizar determinaciones histoquímicas en comparación con los cortes histológicos obtenidos a partir de intestino aislado *in situ*. Esta diferencia observada en el tejido es seguramente consecuencia de la irrigación sanguínea que está presente en este último modelo y ausente en los sacos duodenales evertidos. La falta de irrigación, privaría de una nutrición adecuada al tejido aunque los buffers utilizados tengan nutrientes para mantener la viabilidad celular.

En esta tesis se ha demostrado que el Ca^{2+} produce activación de FAi ligada a membrana, evento que se correlaciona con los mayores descensos de pH observados al aumentar la concentración de Ca^{2+} , fenómeno comprobado a través de sacos duodenales evertidos. Simultáneamente, con concentraciones de Ca^{2+} 50 y 100 mM se alcanza un

debemos tener en cuenta que los cálculos son una sobreestimación debido a que no se consideraron las secreciones y el proceso absorbivo.

valor límite en el pH luminal, evento que se correlaciona con la llegada del transporte de Ca^{2+} a un valor cercano al límite. Si bien en las condiciones experimentales el Ca^{2+} podría precipitar como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, el efecto de esta precipitación sobre la fracción de absorción es despreciable. Por lo tanto, la disminución de la fracción de absorción no se debería a las variaciones del fosfato luminal.

También se ha comprobado que inhibiendo la FAi el descenso de pH es significativamente menor, hecho que se relaciona con una mayor absorción de Ca^{2+} en todas las concentraciones estudiadas. Por lo tanto se plantea que la FAi actuaría como un sensor de la concentración de Ca^{2+} luminal, evitando la entrada masiva del catión al organismo.

9 CONCLUSIONES

1. La FAi purificada obtenida del intestino de la rata liga aproximadamente 8 iones Ca^{2+} /mol de FAi con una constante de afinidad de $19.1 \pm 8.4 \text{ mM}^{-1}$. La FAi se estimula cuando la concentración del catión es menor a 10 mM. Cuando la concentración supera 20 mM, el Ca^{2+} se liga a la FAi pero no sigue el modelo descrito. A estas concentraciones se observa un efecto inhibitorio, acompañado de agregación molecular.

2. *In vivo*, la presencia de Ca^{2+} aumenta su actividad siguiendo una relación directa con la concentración de Ca^{2+} hasta 100 mM. Los modelos utilizados no permiten demostrar si la agregación de FAi inducida por el Ca^{2+} está presente también *in vivo*.

3. Los experimentos detallados en esta tesis, permitirían inferir que la FAi actuaría como un sensor de la concentración de Ca^{2+} luminal, evitando la entrada masiva del catión al organismo. Un aporte alto de Ca^{2+} estimularía la FAi de membrana, generando descenso del pH luminal que inhibiría el canal TRPV6 y así limitaría la entrada del catión. Por otra parte también se puede hipotetizar que el descenso de pH actuaría negativamente sobre la actividad de la FAi, cuyo pH óptimo es 9.8, frenando el proceso desencadenado (Ilustración 44).

4. El fosfato no sería el responsable de la menor absorción de Ca^{2+} a medida que se incrementa la concentración de Ca^{2+} luminal.

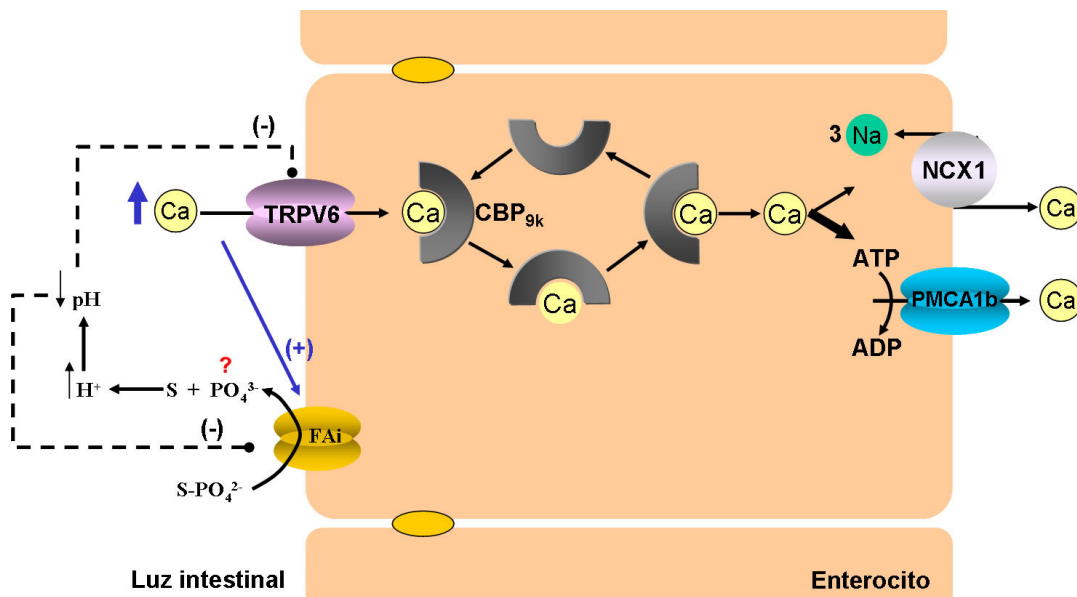


Ilustración 44. Hipótesis del rol de la FAi.

10 ABREVIATURAS

Abs Rel: absorbancia relativa
ACF: adyuvante completo de Freund
ADN: ácido desoxiribonucleico
AEC: 3-amino-9-etilcarbazole
AIF: adyuvante incompleto de Freund
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
Anx: anexina
APSB: buffer Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM pH 9.5
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
Ba²⁺: bario
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
Ca²⁺: calcio
Ca₃(PO₄)₂: fosfato de calcio
CaM: calmodulina
CBP: calbindina
Cd²⁺: cádmio
Cu²⁺: cobre
CV: coeficiente de variación
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
DAG: diacilglicerol
DEA: dietanolamina
DFAIII: difructosa anhídrido III
DFAIV: difructosa anhídrido IV
EGTA: etilenglicol-bis(2-aminoetileter)*N,N,N',N'-ácido tetraacético
ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase
FA: fosfatasa alcalina
FAh: fosfatasa alcalina hepática
FAi: fosfatasa alcalina intestinal
FAo: fosfatasa alcalina ósea
FAp: fosfatasa alcalina placentaria
FAr: fosfatasa alcalina renal
Gd³⁺: gadolinio
HA: hidroxapatita
IEF: isoelectroenfoque

IOD: densidad óptica integrada
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato
La²⁺: lantano
MFP: monofluorofosfato de sodio
Mg²⁺: magnesio
MgCl₂: cloruro de magnesio
ms: milisegundo
Na⁺: sodio
NaF: fluoruro de sodio
NCX: intercambiador Na⁺/Ca²⁺
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb²⁺: plomo
PBS: buffer fosfato salino
Pi: fosfato
pI: punto isoeléctrico
PKA: proteín kinasa A
PKC: proteín kinasa C
PMCA1b: bomba Ca²⁺-ATPasa
pNF: p-nitrofenol
pNFF: p-nitrofenilfosfato
PPi: pirofosfato inorgánico
PTH: parathormona
Rf: relación de frente
s: segundo
SDS: dodecilsulfato sódico
Sr²⁺: estroncio
TRPV: canales epiteliales de Ca²⁺
VDR: receptor de vitamina D
Zn²⁺: zinc

11 AGRADECIMIENTOS

Al **Prof. Dr. Rodolfo C. Puche**, quien entre sus primeras palabras me hizo ver con claridad las primeras 5 letras de “laboratorio”.

Al **Dr. Alfredo Rigalli**, no sólo por haberme brindado su apoyo y confianza incondicional y transmitirme sus conocimientos en la dirección de esta tesis, sino también por haberse entregado de manera completa con su amistad, generosidad y humildad que lo caracterizan. En este marco, logró enseñarme los primeros pasos en este largo camino así como contagiarme la “pasión” por la investigación.

A **María Lorena Brance**, quien no sólo colaboró en experimentos del proyecto, sino que, como esposa, me brindó su apoyo en todo momento.

A **Lucas de Candia, Aneley Traverso y Encarnación Alonso**, quienes en su paso por el laboratorio como becarios alumnos colaboraron en esta línea de investigación.

A los demás integrantes del grupo de investigación no sólo por las enriquecedoras contribuciones en los seminarios de discusión, sino por contribuir a la conformación de un gran grupo humano.

12 REFERENCIAS

- 1 Briancón D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride calcium and vitamin D. *Orthop. Clin North Am*; 12:629-48. 1981.
- 2 Alexandersen P, Riis BJ, Christiansen C. Monofluorophosphate combined with hormone replacement therapy induces a synergistic effect on bone mass by dissociating bone formation and resorption in postmenopausal women: a randomized study. *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 3013-20. 1999.
- 3 Ringe JD, Dorst A, Faber H, Kipshoven C, Rovati LC, Setnikar I. Efficacy of etidronate and sequential monofluorophosphate in severe postmenopausal osteoporosis: a pilot study. *Rheumatol Int*; 25:296-300. 2005.
- 4 Van Dijk A, Glerum JH, Van De Wijngaert FP, Reumakers JA, Duursma SA. Investigation of the relative bioavailability and de bioequivalence of a calcium containing monofluorophosphate effervescent tablet. *J Bone Miner Res*; suppl 1:S238. 1990.
- 5 Setnikar I, Maurer H. Bioequivalence of sodium monofluorophosphate with sodium fluoride and compatibility with calcium. *Arzneimittelforschung*; 40:994-9. 1990.
- 6 Villa A, Rosenkranz C, Garrido A. Fluoride absorption from disodium and calcium monofluorophosphates from the gastrointestinal tract of rats. *Res Comm Chem Path and Pharmacology*; 81:53-67. 1993.
- 7 Setnikar I, Maurer H. Relative bioavailability of fluoride from monofluorophosphate tablets after single oral administration. *Arzneimittelforschung*; 40:323-8. 1990.
- 8 Villa A, Carrasco G, Valenzuela A, Garrido A. The effect of calcium on disodium monofluorophosphate absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Res Comm Chem Path and Pharmacology*; 77(3) 367-74. 1992.
- 9 Rigalli A, Cabrerizo MA, Beinlich AD, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung*; 44:651-5. 1994.
- 10 Farley JR, Tarbaux NM, Lau KH, Baylink DJ. Monofluorophosphate is hydrolyzed by alkaline phosphatase and mimics the actions of NaF on skeletal tissues, in vitro. *Calcif Tissue Int*; 40(1):35-42. 1987.
- 11 Beinlich AD, Brun LR, Rigalli A, Puche RC. Intestinal absorption of disodium monofluorophosphate in the rat as affected by concurrent administration of calcium. *Arzneimittelforschung*; 53:584-9. 2003.
- 12 Benjawatanapon C, Bell LE, Williams L. Ultrastructural localisation of alkaline phosphatase in adult human large intestine. *Gut*; 23(2):134-6. 1982.
- 13 La célula. En Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histología. Texto y Atlas color*. Ed. Panamericana. Buenos Aires. pp 18-52. 1997.
- 14 Segal GH, Petras RE. Small intestine. In Sternberg SS. *Histology for pathologists. Second Edition*. Ed. Lippincott. 1997.
- 15 Smits HL, van Kerkhof PJ, Kramer MF. Isolation and partial characterization of rat duodenal-gland (Brunner's-gland) mucus glycoprotein. *Biochem J*;203(3):779-85. 1982.

- 16 Akiba Y, Guth PH, Engel E, Nastaskin I, Kaunitz JD. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*;279(2):G437-47. 2000.
- 17 McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. *Biochem J*; 181(1):67-73. 1979.
- 18 Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*; 263(24):12002-10. 1988.
- 19 Griffin CA, Smith M, Henthorn PS, Harris H, Weiss MJ, Raducha M, Emanuel BS. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am J Hum Genet*; 41(6):1025-34. 1987.
- 20 Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Geryl H, Van Mullem M, Lepoutre LG, De Broc ME. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin Chem*; 36(6): 875-8. 1990.
- 21 McLachlan R, Coakley J, Murton L, Campbell N. Plasma intestinal alkaline phosphatase isoenzymes in neonates with bowel necrosis. *J Clin Pathol*; 46:654-59. 1993.
- 22 Morton RK. Some properties of alkaline phosphatase of cow's milk and calf intestinal mucosa. *Biochem J*; 60(4):573-82. 1955.
- 23 Cathala G, Brunel C. Bovine kidney alkaline phosphatase. Catalytic properties, subunit interactions in the catalytic process, and mechanism of Mg^{2+} stimulation. *J Biol Chem*; 250(15):6046-53. 1975.
- 24 Harada T, Koyama I, Matsunaga T, Kikuno A, Kasahara T, Hassimoto M, Alpers DH, Komoda T. Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes. *FEBS J*; 272(10):2477-86. 2005.
- 25 Ghosh NI, Fishman WH. On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. *J Biol Chem*; 241(11):2516-22. 1966.
- 26 Stepan J, Volek V, Kolar J. A modified inactivation-inhibition method for determining the serum activity of alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta*; 69:1-9. 1976.
- 27 Shephard MDS, Peake MJ. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity II. Development and clinical application of method for measuring four serum alkaline phosphatase isoenzymes. *J Clin Pathol*; 39:1031-8. 1986.
- 28 Lin CW, Sie HG, Fishman WH. L-tryptophan. A non-allosteric organ-specific uncompetitive inhibitor of human placental alkaline phosphatase. *Biochem J*; 124(3):509-16. 1971.
- 29 Van Belle H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzyme from humans. *Clin Chem*; 22(7):972-6. 1976.
- 30 Peak MJ, Pejakovic M, White GH. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity: estimation of intestinal component. *J Clin Pathol*; 41:202-6. 1988.
- 31 Kuwana T, Rosalki SB. Measurement of alkaline phosphatase of intestinal origin in plasma by p-bromotetramisole inhibition. *J Clin Pathol*; 44(3):236-7. 1991.
- 32 Van Belle H, De Broe ME, Wieme RJ. L-p-bromotetramisole, a new reagent for use in measuring placental or intestinal isoenzymes of alkaline phosphatase in human serum. *Clin Chem*; 23(3):454-9. 1977.

- 33** Lin CW, Fishman WH. L-homoarginine. An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. *J Biol Chem*; 247(10):3082-7. 1972.
- 34** Whitby LG, Moss DW. Analysis of heat inactivation curves of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta*; 59(3): 361-7. 1975.
- 35** Kaplan MM. Alkaline phosphatase. *Gastroenterology*; 62(3):452-68. 1972.
- 36** Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*; 208(3):432-46. 1997.
- 37** Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol*; 50(4):1019-38. 2003.
- 38** Register TC, Wuthier RE. Effect of vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ^{45}Ca and ^{32}Pi uptake by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J Biol Chem*; 259(6):3511-8. 1984.
- 39** Norman AW, Mircheff AK, Adams TH, Spielvogel A. Studies on the mechanism of action of calciferol. 3. Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. *Biochim Biophys Acta*; 215(2):348-59. 1970.
- 40** Grewal R, Mahmood A. Coordinated secretion of alkaline phosphatase into serum and intestine in fat-fed rat. *Indian J Gastroenterology*; 23:175-7. 2004.
- 41** Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH, Millán JL. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cell Biol*; 23: 7525-30. 2003.
- 42** Fernandez NJ, Kidney BA. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol*; 36(3):223-33. 2007.
- 43** Nakano T, Inoue I, Koyama I, Kanazawa K, Nakamura KI, Narisawa S, Tanaka K, Akita M, Masuyama T, Seo M, Hokari S, Katayama S, Alpers DH, Millan JL, Komoda T. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene (*Akp3*) impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 292(5):G1439-49. 2007.
- 44** Matsushita M, Irino T, Stigbrand T, Nakajima T, Komoda T. Changes in intestinal alkaline phosphatase isoforms in healthy subjects bearing the blood group secretor and non-secretor. *Clin Chim Acta*; 277(1):13-24. 1998.
- 45** Yedlin ST, Young GP, Seetharam B, Seetharam S, Alpers DH. Characterization and comparison of soluble and membranous forms of intestinal alkaline. *J Biol Chem*; 236:5620-6. 1981.
- 46** Malik N, Butterworth PJ. Molecular properties of rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 446:105-14. 1976.
- 47** Calhau C, Martel F, Hipolito-Reis C, Azevedo I. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clin Biochem*; 33:571-7. 2000.
- 48** Centeno VA, Díaz de Barboza GE, Marchionatti AM, Alisio AE, Dallorso ME, Nasif R, Tolosa de Talamoni NG. Dietary calcium deficiency increases Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} extrusion mechanism in chick enterocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*; 139:133-41. 2004.

- 49 Moog F, Yeh KY. Intestinal alkaline phosphatase of the rat: development and distribution of activity with phenylphosphate and beta-glycerophosphate. *Comp Biochem Physiol*; 44:657-66. 1973.
- 50 Sussman NL, Eliakim R, Rubin D, Perlmutter DH, DeSchryver-Kecsckemeti K, Alpers DH. Intestinal alkaline phosphatase is secreted bidirectionally from villous enterocytes. *Am J Physiol*; 257:G14-23. 1989.
- 51 Young GP, Yedlin ST, Alpers DH. Distribution of soluble and membranous forms of alkaline phosphatase in the small intestine of the rat. *Biochim Biophys Acta*; 676:257-65. 1981.
- 52 Wada H, Yagami I, Niwa N, Hayakawa T, Tsuge H. Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes. *Exp Anim*; 50(2):153-8. 2001.
- 53 Xie Q, Alpers DH. The two isoenzymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes. *Physiol Genomics*; 3:1-8. 2000.
- 54 Birge SJ, Avioli RC. Intestinal phosphate transport and alkaline phosphatase activity in the chick. *Am J Physiol*; 240(4):E384-90. 1981.
- 55 de Bernard B, Bianco P, Bonucci E, Costantini M, Lunazzi GC, Martinuzzi P, Modricky C, Moro L, Panfili E, Pollesello P, Stagni N, Vittur F. Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca^{2+} -binding glycoprotein. *J Cell Biol*; 103:1615-23. 1986.
- 56 Deliconstantinos G, Kopeikina-tsuboukidou L, Tsakiris S. Perturbations of rat intestinal brush border membranes induced by Ca^{2+} and vitamin D_3 are detected using steady-state fluorescence polarization and alkaline phosphatase as membrane probes. *Bioch Pharmacol*; 35:1633-7. 1986.
- 57 Torresani ME. Enfoque nutricional en la prevención de la osteoporosis. *Actualiz Osteol*; 3(2): 76-80. 2007.
- 58 Norman AW. Vitamin D metabolism and calcium absorption. *Am J Med*; 67(6):989-98. 1979.
- 59 Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*; 289:F8-28. 2005.
- 60 Puche RC, Carlomagno AF, Gonzalez A, Sanchez A. A correlation and path coefficient analysis of calciuria in normal subjects and idiopathic stone formers. *Bone and Mineral*; 2:405. 1987.
- 61 Favus MJ, Bushinsky DA, Leamann J. Regulation of calcium, magnesium and phosphate metabolism. In *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism*. 6ta ed. American Society for Bone and Mineral Research. 2006.
- 62 Bronner F. Mechanism of intestinal calcium absorption. *J Cel Biochem*; 88:387-93. 2003.
- 63 Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca^{2+} transport. *Biochim Biophys Acta*; 1600:6-11. 2002.
- 64 Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*; 85(1):373-422. 2005.
- 65 Kutuzova GD, Deluca HF. Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin $\text{D}(3)$ stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. *Arch Biochem Biophys*; 432(2):152-66. 2004.
- 66 Pérez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion*; 77(1):22-34. 2008.

- 67** Hoenderop JG, Vand der Kemp AW, Hartog A, Van de Graaf SF, Van Os CH, Willems PH and Bindels RJ. Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -responsive epithelia. *J Biol Chem*; 274:8375-8. 1999.
- 68** Yeh BI, Sun TJ, Lee JZ, Chen HH, Huang CL. Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J Biol Chem*; 278(51):51044-52. 2003.
- 69** Peng J, Brown EM, Hediger MA. Epithelial Ca^{++} entry channels: transcellular Ca^{++} transport and beyond. *J Physiol*; 551(3):729-40. 2003.
- 70** Peng J, Brown EM, Hediger MA. Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci*. 18:158-63. 2003.
- 71** Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem*; 88(2):332-9. 2003.
- 72** Balesaria S, Sangha S, Walters J. Human duodenum responses to vitamin D metabolites of TRPV6 and other genes involved in calcium absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. In press, 2009.
- 73** Kutuzova GD, Sundersingh F, Vaughan J, Padmaja Tadi B, Ansay SE, Chrystakos S, DeLuca HF. TRPV6 is not required for $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 -induced intestinal calcium absorption in vivo. *Proc Natl Acad Sci*; 105(50):19655-9. 2008.
- 74** Brown AJ, Krits I, Armbrrecht HJ. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch Biochem Biophys*; 437(1):51-8. 2005.
- 75** Armbrrecht HJ, Boltz MA, Bruns ME. Effect of age and dietary calcium on intestinal calbindin D-9k expression in the rat. *Arch Biochem Biophys*; 420(1):194-200. 2003.
- 76** Bronner F. Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*; 300(1):47-52. 2003.
- 77** Nemere I. Vesicular calcium transport in chick intestine. Symposium Current concepts of calcium absorption. 75th annual meeting for the Federation of American Society for experimental biology, Atlanta, 1991.
- 78** Van den Heuvel E, Muys T van Dokkum and Schafsma G. Oligo/fructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr*; 69: 544-548. 1999.
- 79** Hara H, Kondo K. Difructose anhydrides III and IV equally promote calcium absorption from the lumenally perfused rat small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem*; 69(4):839-41. 2005.
- 80** Suzuki T, Hara H. Various nondigestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium signaling in human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr*; 134(8):1935-41. 2004.
- 81** Raschka L, Daniel H. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*; 37(5):728-35. 2005.
- 82** Tokunaga T. Novel physiological function of fructooligosaccharides. *Biofactors*; 21:89-94. 2004.
- 83** Jewell C, Cashman KD. The effect of conjugated linoleic acid and medium-chain fatty acids on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells. *Br J Nutr*; 89(5):639-47. 2003.

- 84** Anderson JJ, Garner SC. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*; 12(4): 543-57. 1998.
- 85** Camara-Martos F, Amaro-Lopez MA. Influence of dietary factors on calcium bioavailability: a brief review. *Biol Trace Elem Res*; 89(1):43-52. 2002.
- 86** Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. *Nutrition*; 18(9):743-6. 2002.
- 87** Kumagai H, Koizumi A, Sato N, Ishikawa Y, Suda A, Sakurai H, Kumagai H. Effect of phytate-removal and deamidation of soybean proteins on calcium absorption in the in situ rats. *Biofactors*; 22:21-4. 2004.
- 88** Tanrattana C, Charoenphandhu N, Limlomwongse L, Krishnamra N. Prolactin directly stimulated the solvent drag-induced calcium transport in the duodenum of female rats. *Biochim Biophys Acta*; 1665:81-91. 2004.
- 89** Shiga K, Hara H, Takahashi T, Aoyama Y, Furuta H, Maeda H. Ingestion of water-soluble soybean fiber improves gastrectomy-induced calcium malabsorption and osteopenia in rats. *Nutrition*; 18:636-42. 2002.
- 90** Heaney RP, Weaver CM, Recker RR. Calcium absorption from spinach. *Am J Clin Nutr*; 47: 707-9. 1998.
- 91** Hallberg L, Hulthén L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr*; 71(5):1147-60. 2000.
- 92** Weaver CM, Plawecki KL. Dietary calcium: adequacy of a vegetarian diet. *Am J Clin Nutr*; 59: 1238-41. 1994.
- 93** Wyshak G. Teenaged Girls, Carbonated Beverage Consumption, and Bone Fractures. *Arch Pediatr Adolesc Med*; 154:610-3. 2000.
- 94** Orihuela D, Meichtry V, Pizarro M. Aluminium-induced impairment of transcellular calcium absorption in the small intestine: calcium uptake and glutathione influence. *J Inorg Biochem*; 99(9):1879-86. 2005.
- 95** Tiwari S, Gupta SK, Kumar K, Trivedi R, Godbole MM. Simultaneous exposure of excess fluoride and calcium deficiency alters VDR, CaR, and calbindin D_{9k} mRNA levels in rat duodenal mucosa. *Calcif Tissue Int*; 75(4):313-20. 2004.
- 96** Ohta H, Ichikawa M, Seki Y. Effects of cadmium intake on bone metabolism of mothers during pregnancy and lactation. *Tohoku J Exp Med*; 196(1):33-42. 2002.
- 97** Marchionatti AM, Diaz de Barboza GE, Centeno VA, Alisio AE, Tolosa de Talamoni NG. Effects of a single dose of menadione on the intestinal calcium absorption and associated variables. *J Nutr Biochem*; 14(8):466-72. 2003.
- 98** Cotter AA, Jewell C, Cashman KD. The effect of oestrogen and dietary phyto-oestrogens on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells. *Br J Nutr*; 89(6):755-65. 2003.
- 99** Van Abel M, Hoenderop JG, Dardenne O, St Arnaud R, Van Os CH, Van Leeuwen HJ, Bindels RJ. 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol*; 13(8):2102-9. 2002.

- 100** Davies KM, Rafferty K, Heaney RP. Determinants of endogenous calcium entry into the gut. *Am J Clin Nutr*; 80(4):919-23. 2004.
- 101** Font MT, Garroq O, Martinez Z, Morini JC, Puche RC, Tarrés MC. The inbred II M/Fm stock. *Rat News*; 25:28-9. 1991.
- 102** US Department of Health and Human Services. NIH Publication N° 86-23, revised 1985, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
- 103** Canadian Council on animal care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. www.ccac.ca.
- 104** Brun LR, Di Loreto V. Bioethics and animal care. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 3-7. 2009.
- 105** Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*; 51:660-72. 1949.
- 106** Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press. New York. Pp 111-81. 1986.
- 107** *Data for Biochemical Research*, 3rd ed., Dawson R.M.C, et al. Oxford University Press (New York, NY), pp 404-5. 1986.
- 108** Nakasaki H, Matsushima T, Sato S, Kawachi T. Purification and properties of alkaline phosphates from the mucous of rat small intestine. *J Biochem (Tokyo)*; 86(5):1225-31. 1979.
- 109** Furusaki K. Alkaline phosphates of the rat small intestine-purification of the enzyme and its physiological significance. *Hokkaidogaku Zasshi*; 58(3):250-64. 1983.
- 110** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54. 1976.
- 111** *Current Protocols in molecular Biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. USA. 2000.
- 112** Pera LI, Brun LR, Rigalli A. Polyclonal antibodies preparation. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 217-20. 2009.
- 113** Outcherlony O. Antigen-antibody reactions in gel. *Acta Pathol Microbiol Scand*; 26:507-11. 1948.
- 114** Hoffmann EM, Muetzel S, Becker K. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. *Br J Nutr*; 87:421-6. 2002.
- 115** Graham RC Jr, Lundholm U, Karnovsky MJ. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J Histochem Cytochem*; 13:150-2. 1965.
- 116** Fahimi HD, Herzog V. A colorimetric method for measurement of the (peroxidase-mediated) oxidation of 3,3'-diaminobenzidine. *J Histochem Cytochem*; 21(5):499-502. 1973.
- 117** Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*; 227:680-5. 1970.
- 118** O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*; 250

- (10):4007-21. 1975.
- 119** Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*; 156(2):341-7. 1986.
- 120** Brance ML, Brun LRM, Rigalli A. In situ isolation of the intestinal loop. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 95-97. 2009.
- 121** Manis J, Schachter D. Active transport of iron by intestine: Features of the two steps mechanism. *Am J Physiol*; 203:73. 1961.
- 122** Brun LR, Brance ML, de Candia LF, Rigalli A. Intestinal everted sacs. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 99-101. 2009.
- 123** Brance ML, Brun LR. Histological procedures. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 221-7. 2009.
- 124** Mozes S, Lenhardt L, Martinkova A. A quantitative histochemical study of alkaline phosphatase activity in isolated rat duodenal epithelial cells. *Histochem J*; 30(8):583-9. 1998.
- 125** Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*; 42:405-26. 2005.
- 126** Brun LR, Brance ML, Rigalli A, Puche RC Effect of calcium on rat intestinal alkaline phosphatase activity and molecular aggregation. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 21(6):757-63. 2006.
- 127** Hodgman CD, Weast RC, Selby SM. *Handbook of chemistry and physics*. Edition 14. Chemical Rubber Publishing Co. Cleveland, Ohio. USA. 1958.
- 128** Bikle DD, Zolock DT, Munson S. Differential response of duodenal epithelial cells to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ according to position on the villus: a comparison of calcium uptake, calcium-binding protein, and alkaline phosphatase activity. *Endocrinology*; 115(6):2077-84. 1984.
- 129** Fontaine N. Alkaline phosphatase and calcium-binding properties in the intestine of the rat. *Arch Int Physiol Biochim*; 89: 207-16. 1981.
- 130** Fournier P, Dupuis Y, Tardivel S. Effects of alkaline phosphatase inhibitors on intestinal transfer of calcium. *Pathol Biol (Paris)*; 36:819-24. 1988.
- 131** Yeh JK, Aloia JF. Intestinal calcium and phosphate transport and intestinal alkaline phosphatase. *Bone Miner*; 1: 297-306. 1986.
- 132** Nagata A, Komoda T, Sakagishi Y. Relationship between the uptake of calcium or phosphorus and alkaline phosphatase activity induced by certain modulators in rat organs. *Calcif Tissue Int*; 45:173-81. 1989.
- 133** Komoda T, Sakagishi Y, Sekine T. Multiple forms of human intestinal alkaline phosphatase: chemical and enzymatic properties, and circulating clearances of the fast- and slow-moving enzymes. *Clin Chim Acta*; 117(2):167-87. 1981.
- 134** Engle MJ, Mahmood A, Alpers DH. Two rat intestinal alkaline phosphatase isoforms with different carboxyl-terminal peptides are both membrane-bound by a glycan-phosphatidylinositol linkage. *J Biol Chem*; 270:11935-40. 1995.

- 135** Saini PK, Posen S. The origin of serum alkaline phosphatase in the rat. *Biochim Biophys Acta*; 177: 42-9. 1969.
- 136** Eliakim R, Mahmood A, Alpers DH. Rat intestinal alkaline phosphatase secretion into lumen and serum is coordinately regulated. *Biochim Biophys Acta*; 1091:1-8. 1991.
- 137** Liu TZ, Chou LY, Humphreys MH. Inhibition of intestinal alkaline phosphatase by palladium. *Toxicology Letters*; 4:433-8. 1979.
- 138** Warner GP, Hubbard HL, Lloyd GC, Wuthier RE. 32-Pi and 45-Ca-metabolism by matrix vesicles-enriched microsomes prepared from chicken epiphyseal cartilage by isosmotic Percoll density-gradient fractionation. *Calcif Tissue Int*; 35:327-38. 1983.
- 139** Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A. Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L-homoarginine and its regulation by subunit-subunit interaction. *Jpn J Pharmacol*; 64(2):97-102. 1994.
- 140** Griffiths WC, Camara PD, Rosner M, Lev R, Brooks EM. Prevalence and properties of the intestinal alkaline phosphatase identified in serum by cellulose acetate electrophoresis. *Clin Chem*; 38(4):507-11. 1992.
- 141** Pike SJ, Duggleby RG. Resistance to inactivation by EGTA of the enzyme-substrate and enzyme-phosphate complexes of alkaline phosphatase. *Biochem J*; 244(3):781-5. 1987.
- 142** Schedl HP, Wilson HC. Calcium uptake by intestinal brush border membrane vesicles. Comparison with in vivo calcium transport. *J Clin Invest*; 76:1871-8. 1985.
- 143** Holmes RP, Mahfouz M, Travis BD, Yoss NL, Keenan MJ. The effect of membrane lipid composition on the permeability of membranes to Ca^{2+} . *Ann NY Acad Sci*; 414:44-56. 1983.
- 144** Fournier P, Fontaine N, Fournier A. New correlation between absorption of calcium and activity of intestinal alkaline phosphatases. *Ann Nutr Aliment*; 31(3):277-90. 1977.
- 145** Dupuis Y, Tardivel S, Porembaska Z, Fournier P. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors on intestinal calcium transfer. *Int J Biochem*; 23(2):175-80. 1991.
- 146** Bindels RJ, Hartog A, Abrahamse SL, van Os CH. Effects of pH on apical calcium entry and active calcium transport in rabbit cortical collecting system. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*; 266:F620-7. 1994.