

Desarrollo y aplicación de métodos radioisotópicos para medir la absorción intestinal de calcio en animales de experimentación

Meichtry, Verónica; Orihuela, Daniel*

Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

RESUMEN: Desarrollamos en nuestras condiciones de trabajo, métodos *in vivo* e *in vitro* para evaluar el transporte intestinal de calcio (Ca) utilizando el radioisótopo ^{45}Ca como marcador de flujo, en intestino delgado de rata y pollo. Mediante los segmentos intestinales ligados *in situ* se estudió la cinética, Ca absorbido vs. $[\text{Ca}^{2+}]$ total luminal variando de 10 a 200 mM, en ratas Wistar. Se cuantificaron los parámetros cinéticos de los dos procesos principales del transporte: el saturable y el pasivo. En células duodenales aisladas de pollo se midió la captación de ^{45}Ca *in vitro* estudiando el efecto de drogas que alteran la entrada de Ca en el enterocito (ionóforo A23187 y bloqueador nifedipina). Con los sacos duodenales de rata evertidos *in vitro* se analizó el transporte activo transcelular de Ca. Se realizaron estudios complementarios de viabilidad e integridad estructural de las preparaciones intestinales *in vitro*. Todos los resultados obtenidos fueron coherentes con los reportados en la bibliografía. Estos métodos pueden ser utilizados para estudiar nuevos aspectos de la regulación fisiológica, así como los efectos de sustancias tóxicas que actúen sobre la absorción intestinal del Ca.

Palabras claves: Absorción de ^{45}Ca ; Segmentos intestinales *in situ*; Enterocitos aislados; Sacos duodenales evertidos; A23187; Nifedipina.

SUMMARY: Development and use of radioisotopic methods to measure the intestinal calcium absorption in experimentation animals. Meichtry, Verónica; Orihuela, Daniel. We developed, in our work conditions, both *in vivo* and *in vitro* methods to measure the intestinal calcium (Ca) absorption using the radiocalcium ^{45}Ca as flux marker, in small intestine of rat and chicken. We studied the kinetics of intestinal Ca transport in Wistar rats by means of *in situ* ligated duodenal loops technique, at total Ca luminal concentrations varying of 10 to 200 mM. The main processes of Ca transport, both saturable and passive ones, were evaluated. In isolated chicken duodenal cells, the *in vitro* ^{45}Ca uptake was measured and the effects of a calcium ionophore (A23187) and a calcium blocker (nifedipine) were assayed. The active transcellular calcium transport was analyzed in rat duodenal everted sacs. Viability and structural integrity studies of the *in vitro* intestinal preparations were carried out. All the obtained results were coherent with those reported in the literature. The methods described here can be used to study either new aspects of physiological regulation or the effects of toxic substances that could act on the intestinal calcium absorption.

Key words: ^{45}Ca absorption; *In situ* intestinal segments; Isolated enterocytes; Everted duodenal sacs; A23187; Nifedipine.

Introducción

El calcio es el catión más abundante en el organismo humano. Es bien conocida su función de primer y segundo mensajero en la transducción de señales celulares y componente esencial del mineral óseo. La homeostasis del calcio en los fluidos orgánicos está estrechamente controlada por hormonas calciotrópicas que actúan sobre el hueso, riñón e intestino (e.g. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 , parathormona,

calcitonina) (1). La disponibilidad del calcio dietario es un determinante crítico de su homeostasis. Para asegurar un adecuado suministro de calcio al organismo, los intestinos de la mayoría de los vertebrados han desarrollado mecanismos especializados de absorción dependientes e independientes de la vitamina D. El calcio se absorbe principalmente en el intestino delgado mediante dos mecanismos básicos: un proceso saturable, transcelular, que ocurre fundamentalmente en las primeras porciones (duodeno y yeyuno proximal) cuando el calcio de la dieta es limitado, y un proceso no-saturable, vía paracelular, pasivo, que tiene la misma intensidad a lo largo del intestino delgado, y que predomina cuando el calcio dietario es abundante (2).

La vía transcelular es un proceso en tres etapas que comprende: a) entrada del calcio iónico en

* Correspondencia a:
Dr. Daniel Orihuela
Cátedra Fisiología Humana, FBCB, UNL
Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina
Fax: +54-342-4575221. E-mail: orihuela@fbc.unl.edu.ar

la célula epitelial desde el lumen a través de la microvellosidad y de la membrana del "brush border" que se realiza a favor de un gradiente electroquímico vía canales epiteliales de calcio (ECaC y CaT1) (3); b) tránsito a través del citosol desde el polo apical al polo basolateral tanto en forma libre, unido a proteínas transportadoras específicas (calbindin-D) como dentro de vesículas endosomales y c) salida o extrusión de la célula, atravesando las membranas basolaterales, mediante una bomba de calcio dependiente del ATP, un intercambiador sodio-calcio, canales de calcio y la exocitosis de las vesículas que contienen calcio. El movimiento intracelular de calcio es considerado el paso limitante de la velocidad de transporte por esta vía (2).

Diversos métodos de estudio de la absorción intestinal de calcio están basados en el uso de isótopos radiactivos del catión (e.g. ^{45}Ca β emisor, ^{47}Ca γ emisor) y permiten cuantificar el flujo de calcio a través de cada una de las vías de transporte descriptas, de manera específica y con una elevada sensibilidad (4,5).

En el método de los segmentos intestinales ligados *in situ* descrito por Pansy y col. (6) y Schleifer y col. (7), un segmento cerrado de intestino es llenado con una solución de calcio conteniendo el marcador radiactivo, y vuelto a colocar en la cavidad abdominal, el animal permanece consciente durante el período de estudio. Midiendo la radiactividad instilada y la remanente se calcula el calcio absorbido. Trabajando con distintas concentraciones de calcio dentro de cada segmento es posible estudiar la curva de la cinética de la absorción y mediante un análisis matemático de la misma discriminar los dos procesos principales: el saturable y el difusivo.

La entrada de calcio en el enterocito se puede medir en células epiteliales aisladas *in vitro*. En el método general descrito inicialmente por Liang y col. (8) los enterocitos se separan de la mucosa intestinal mediante un tratamiento enzimático con hialuronidasa bajo agitación constante del medio de incubación gaseado con carbógeno. Las células aisladas se incuban en un medio conteniendo el marcador radiactivo. La captación de calcio se bloquea agregando La^{3+} y EGTA en frío y se determina la radiactividad del pellet de células separado por centrifugación rápida (9).

Los sacos intestinales evertidos se utilizan desde hace mucho tiempo, para estudiar los procesos de transporte activo de distintas sustancias. En el

caso del calcio se puede evaluar la absorción por la vía transcelular. En éste método un segmento de intestino se evert, se llena con el buffer de prueba, se ligan los extremos y se coloca en una solución del mismo buffer conteniendo el radioisótopo de calcio. En condiciones de aerobiosis los sacos duodenales concentran el calcio en el fluido seroso, en contra de un moderado gradiente de calcio. Este proceso puede ser inhibido incubando los sacos en condición de microoxia. La concentración de calcio en la solución serosa aumenta rápidamente con el aumento de la concentración de calcio en el buffer alcanzando un máximo a 1 mM de calcio (2).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar diferentes métodos, en las condiciones de nuestro laboratorio, que permitan cuantificar el transporte intestinal de calcio utilizando ^{45}Ca como marcador de flujo, en intestino delgado de rata y pollo. Con ellos se estudiaron los distintos mecanismos del proceso de la absorción intestinal del calcio y la influencia de las variables involucradas.

Materiales y Métodos

Cinética de la absorción de calcio en segmentos intestinales ligados *in situ*

Se usaron ratas cepa Wistar, machos adultos (peso promedio 267 ± 6 g), criadas en condiciones ambientales controladas (temperatura: 22 ± 3 °C; humedad: 50 %; ciclo luz/oscuridad: 14 h/10 h) y alimentadas con una dieta comercial para roedores. Se mantuvieron en ayunas durante las 24 hs. previas y tuvieron libre acceso a agua desionizada.

Se utilizaron soluciones de 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 y 200 mM de CaCl_2 , agregando a cada una la cantidad suficiente de NaCl para hacerla isosmolar (290 mOsm/kg). Se adicionaron $2 \mu\text{Ci/ml}$ de $^{45}\text{CaCl}_2$ a cada solución.

Los animales se anestesiaron con éter etílico y se expuso el intestino delgado mediante un corte en la línea media. Se utilizaron los primeros 20 cm distales al píloro. Se realizó la primera ligadura en el segmento elegido y luego de lavar por dentro con 0,5 ml de salina normal, se instiló 1 ml de la solución de calcio, que contenía ^{45}Ca . Se ajustó la segunda ligadura quedando formado un segmento intestinal cerrado *in situ* de ~10 cm. Se colocó el intestino dentro de la cavidad abdominal y se suturó el corte. De

cada animal se obtuvieron dos segmentos con concentraciones similares de calcio luminal.

Las ratas se pusieron en jaulas individuales manteniéndose la temperatura corporal con una lámpara infrarroja colocada por encima de la jaula. Se dejaron en estas condiciones por un período de 150 minutos, durante el cual permanecieron conscientes. Al cabo de este tiempo los animales se volvieron a anestésiar con éter, y se extrajeron cuidadosamente los segmentos intestinales. Se midió exactamente la distancia entre las ligaduras de cada segmento, usando una regla milimetrada. Cada segmento fue disuelto con NO_3H 6 N en caliente, bajo campana con extractor de aire. Se determinó la radiactividad tanto de la solución instilada como de la solución resultante de la digestión ácida del intestino.

El calcio absorbido en cada segmento intestinal es la diferencia entre la cantidad de calcio instilada y la cantidad remanente en el intestino, al final del período considerado. Se calculó mediante la siguiente fórmula (10):

$$\mu\text{mol } \text{Ca}^{2+} \text{ absorbido}/10\text{cm} = \frac{(\text{cpm}_i - \text{cpm}_f)}{\text{cpm}_i} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot V_i \cdot \frac{10}{L} \quad (I)$$

Donde cpm_i son las cuentas por minuto de la solución de ^{45}Ca instilada en el segmento intestinal, cpm_f son las cuentas por minuto finales remanentes luego de la digestión del segmento intestinal, V_i es el volumen instilado dentro del segmento intestinal (en ml), $[\text{Ca}^{2+}]$ es la concentración de calcio total de la solución instilada (en $\mu\text{mol}/\text{ml}$) y L es la longitud del segmento intestinal (en cm).

La curva de absorción se consideró descripta por la siguiente ecuación (6):

$$J_{m \rightarrow s} = \frac{J_{\max} \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_t + [\text{Ca}^{2+}]} + P_d \cdot [\text{Ca}^{2+}] \quad (II)$$

Donde $J_{m \rightarrow s}$ es el calcio total absorbido desde el lumen intestinal hacia el cuerpo, J_{\max} es el calcio máximo absorbido por el proceso saturable, $[\text{Ca}^{2+}]$ es la concentración luminal total de calcio, K_t representa la concentración de calcio a la cual se obtiene la mitad del calcio máximo absorbido por el mecanismo saturable y P_d es la constante de difusión del

proceso no saturable (en unidades de $\mu\text{mol Ca}$ absorbido/ mM).

Experimentalmente $J_{m \rightarrow s}$ representa la cantidad de calcio absorbido, calculado aplicando la ecuación (I). Se graficaron los datos de $J_{m \rightarrow s}$ en función de la concentración luminal de calcio y se determinaron los parámetros J_{\max} , K_t y P_d mediante un método de ajuste no lineal.

Captación de ^{45}Ca por células duodenales aisladas

Estos experimentos se llevaron a cabo con pollos (*Gallus domesticus*) de tres semanas de vida, alimentados con una dieta balanceada comercial. En experiencias previas los enterocitos de pollo mostraron mejores índices de viabilidad que los enterocitos de rata, en las condiciones de trabajo. Se anestésió el animal con éter etílico. Se extrajeron los primeros 15 cm de intestino delgado y se lavó por dentro tres veces con solución de lavado inicial (NaCl 0,9 %, glucosa 1 g/L, pH 7 a 25 °C) fría, usando una aguja de punta roma, liberando de adherencias. Se abrió el intestino con un corte longitudinal y se cortaron segmentos de 1-2 cm. Estos se colocaron en frasco plástico con 14 ml de medio de aislamiento A (manitol 240 mM, K_2PO_4 3 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, NaCl 10 mM, glutamina 2,5 mM, HEPES 20 mM, glucosa 5,6 mM, BSA 2 mg/ml, penicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, streptomycin 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7,4 a 25 °C) incubando durante 15 minutos a 37 °C en baño Dubnoff con agitación a 60 oscilaciones/min con burbujeo constante de carbógeno (O_2 (95%)/ CO_2 (5%)). Se trasvasó a un tubo plástico de fondo cónico y se centrifugó a 500 g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se reemplazó con 14 ml de medio de aislamiento B (idem medio A adicionado con hialuronidasa 4 U.I./ml, pH 7,4 a 25 °C). Se incubó nuevamente 15 minutos en las condiciones antes mencionadas. A continuación se despegaron las células con un agitador magnético durante 30 segundos a la máxima velocidad. Se filtró la suspensión celular entre dos capas de gasa estéril para separar los restos de tejido intestinal, recogiendo el filtrado en un tubo plástico de fondo cónico. Las células se lavaron tres veces con medio de aislamiento A, agregando 10 ml y centrifugando 1 minuto a 1.000 g cada vez, descartando los sobrenadantes. Finalmente fueron resuspendidas en 2 ml de medio A y mantenidas

en baño de agua a 37°C en atmósfera de O₂(95%)/CO₂(5%).

Se determinó la viabilidad de las células aisladas por la prueba de exclusión del colorante Trypan blue al 0,2 % (11) y simultáneamente se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer (dilución 1/20) dentro de los siguientes 5 minutos. La concentración final se ajustó a un valor de 1 x 10⁷ células viables/ml, realizando la dilución apropiada con medio A.

Complementariamente se midió la actividad de la enzima sucrasa-isomaltasa, un marcador específico de las células epiteliales maduras del intestino, mediante el método descripto por Lee y col. (12).

Se ensayó el efecto de un activador de los canales de calcio (ionóforo A23187) y de un bloqueador de los canales de calcio tipo L (nifedipina) sobre la captación de ⁴⁵Ca. Para ello se preincubaron 200 µl de suspensión celular en las siguientes condiciones experimentales: a) Nifedipina 10 µM, b) A23187 1 nM y c) vehículo (dimetilsulfóxido 5 µl), en atmósfera de O₂(95%)/CO₂(5%) a 37°C con agitación suave de 20 oscilaciones/min. durante 30 minutos. Cada condición se realizó en triplicado. Luego se agregaron 100 µl de medio de captación (KCl 140 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, ⁴⁵Ca 5 µCi/ml, pH 7,2 a 25 °C) y se incubó por 5 minutos. La captación se bloqueó con 1,5 ml de solución de paro (KCl 140 mM, HEPES 10 mM, EGTA 2 mM, LaCl₃ 1 mM, pH 7,2 a 25 °C) fría y rápidamente se centrifugó a 3.500 g durante 45 segundos. Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente con un sistema de vacío. El pellet resultante se solubilizó en 1 ml de NaOH 1N - SDS 0,1% agitando con vortex. Se midió la actividad de ⁴⁵Ca del pellet solubilizado (CPM_{pellet}) y de una alícuota de 100 µl de medio de captación (CPM_{ini}). La concentración de proteínas se determinó por el método de Gornall modificado (13) usando albúmina sérica bovina 5 mg/ml como testigo.

El calcio captado se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$nmolCa / mg_{PROTEINAS} = \frac{CPM_{pellet} \cdot [Ca^{2+}] (nmol / ml)}{CPM_{ini} \cdot [PROT] (mg / ml)} \quad (III)$$

La concentración de calcio total (Ca²⁺) en el medio final de incubación se calculó mediante el

programa de computación ALEX, desarrollado por el Dr. Michel Vivaudou (14), teniendo en cuenta las constantes de estabilidad de todas las especies químicas de calcio presentes en la solución acuosa.

Transporte de calcio en sacos intestinales evertidos

Los animales (ratas Wistar, machos adultos, rango de peso 235-265 g) se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, por vía i.p.), el intestino delgado se removió siguiendo una incisión en la línea media abdominal y una transección del intestino a nivel del píloro y el cecum. Se cortó un segmento de 10 cm proximal (duodeno), se lavó con solución salina normal (NaCl 0,9 %, pH 7 a 25 °C) enfriada con hielo, se evertió con una varilla de vidrio de punta redondeada y se ligó en un extremo. Se instilaron 0,3 ml de buffer seroso, pregaseado con O₂(95%)/CO₂(5%) y entibiado a 37°C, mediante una jeringa provista con una aguja sin bisel a través de la segunda ligadura floja en el otro extremo. Se removió la aguja, se ajustó la segunda ligadura y cada saco fue transferido a un recipiente individual conteniendo el buffer mucoso pregaseado y entibiado. El tiempo total desde la remoción del intestino no superó los 10 minutos (15). Los sacos se incubaron durante 45 minutos en un baño de agua a 37°C y la solución mucosa fue continuamente burbujeada con O₂(95%)/CO₂(5%). Para determinar el flujo de calcio aparente (JCa_{ms}) duodenal en condiciones de microxia, las soluciones fueron gaseadas con N₂ y la temperatura de incubación fue de 0°C (2). Al final del período de incubación el fluido seroso se recuperó del interior de los sacos drenando su contenido. Solo fueron considerados los sacos con un 80% de recuperación o más. Los sacos se abrieron mediante un corte longitudinal, se secaron con una hoja de papel de filtro y se pesaron en una balanza analítica. Todos los sacos llenos se pesaron antes y después de la incubación.

La composición tanto del buffer mucoso como del seroso fue: NaCl 125 mM, KCl 4 mM, glucosa 10 mM, CaCl₂ 1 mM y Tris-ClH 30 mM (pH 7,2 a 25 °C). Se agregaron 0,40 µCi/ml de Cl₂[⁴⁵Ca] al buffer mucoso. El contenido de ⁴⁵Ca de los fluidos mucoso y seroso, inicial y final se determinó midiendo la radiactividad de 100 µl de cada muestra.

El flujo de calcio mucoso-seroso aparente se calculó mediante la siguiente fórmula, adaptada de Adler y col. (4):

$$JCa_{m,s} = \frac{[^{45}Ca]_{sf} \cdot V_{sf}}{SA \cdot W \cdot t} \quad (IV)$$

Donde $[^{45}Ca]_{sf}$ es la concentración serosa final (en cpm/ml), V_{sf} es el volumen seroso final (=0,3 (Wf - W)/(Wi - W)) en ml, SA es la actividad específica media (cpm/ μ mol), W es el peso húmedo del saco vacío (en g), t es el tiempo de incubación (en horas), Wi y Wf son respectivamente el peso del saco lleno al principio y al final. Los resultados se expresaron en μ mol calcio/h/g tejido húmedo.

Adicionalmente se obtuvo el caudal de agua a través de la pared intestinal (en ml/hr), que se calculó por diferencia entre el volumen seroso inicial y final, dividido el tiempo de incubación.

Se evaluó la viabilidad y la integridad estructural de los sacos intestinales para investigar el efecto del tiempo de incubación. La velocidad de captación de glucosa desde el fluido mucoso se utilizó como un índice de la integridad funcional de las preparaciones intestinales aisladas (16). La enzima fosfatasa alcalina está presente en la región del "brush border" de las células epiteliales intestinales y su actividad en el medio mucoso se usó como un índice del daño celular (16). Los segmentos intestinales fueron histológicamente examinados inmediatamente después de la eversión y al final del período de incubación. Las muestras para microscopía óptica fueron fijadas en formalina al 10% (p/v) en buffer de fosfatos de pH 7 (a 25 °C), incluidas en parafina, seccionadas y coloreadas con Hematoxilina-Eosina (15).

Las concentraciones de glucosa se midieron con el método de la glucosa-oxidasa (17). La actividad de fosfatasa alcalina en el medio mucoso se determinó por el método cinético descrito por Bowers y Mc Comb (18).

Medición del radioisótopo de calcio

Se utilizó ^{45}Ca , un emisor β puro, en la forma química de $[^{45}Ca]Cl_2$ de una actividad específica de 20 mCi/mg, sin portador (NEN Dupont, Boston, U.S.A).

Las actividades de ^{45}Ca de todas las muestras líquidas se midieron en un detector GM de ventana delgada acoplado a un espectrómetro (Alfa Nuclear, Argentina) a un voltaje de trabajo óptimo de 580-600 V, dispuestas en cazoletas de acero inoxidable de 5 cm de diámetro, con una geometría constante (volumen final de lectura: 1 ml), en duplicado. El tiempo de conteo se calculó de acuerdo a la relación entre la actividad estimada de cada muestra y el fondo, aplicando las fórmulas estadísticas convencionales para la desintegración radiactiva, variando entre 1 y 5 minutos (19). La actividad medida se expresó en cuentas por minuto (cpm).

Se siguieron las normas de seguridad establecidas por la autoridad nuclear argentina para el manejo de radioisótopos en experimentos biológicos (20).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron examinados por análisis de asimetría y resultaron estar normalmente distribuidos. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar de la media. Los promedios de dos grupos se compararon mediante el test t de Student para datos agrupados. Las comparaciones múltiples de promedios se realizaron por análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls (21). La curva de absorción de calcio *in situ* se ajustó con un método de ajuste no lineal utilizando el algoritmo de Marquardt-Levenburg (22). El nivel de significación fue fijado en 0,05 (21).

Resultados

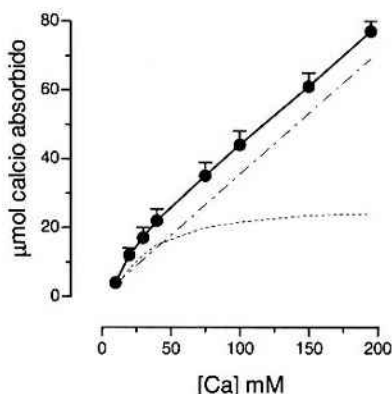
Segmentos intestinales *in situ*

La figura 1 muestra que la absorción de calcio fue dependiente de la concentración. Un incremento en la concentración luminal de calcio provocó un aumento del calcio absorbido, en una forma curvilínea. Claramente se observa que la absorción total medida es la suma punto a punto de la recta correspondiente al transporte pasivo y la curva de saturación del transporte activo. Asimismo se ve la influencia relativa de cada proceso para cada concentración de calcio luminal. Los parámetros cinéticos de la curva expresados como el valor calculado \pm D.S para un límite de confianza del 95%, fue-

ron los siguientes: $J_{max} = 20,63 \pm 2,33$ $\mu\text{mol Ca}$ absorbido/10 cm; $K_t = 78,92 \pm 11,47$ mM y $P_d = 0,303 \pm 0,078$ $\mu\text{mol Ca}$ absorbido/mM. Los parámetros J_{max} y P_d son similares a los reportados

por Pansu y col. (6) para ratas Wistar. El parámetro K_t resultó más elevado, aunque del mismo orden de magnitud, atribuible probablemente a una diferencia propia de la cepa.

Figura 1. Curva de la cinética de la absorción de calcio en duodeno-yeyuno de ratas Wistar machos, medida por el método de los segmentos intestinales ligados *in situ*. La absorción se expresa en μmol de calcio/10 cm de intestino delgado. Los datos son promedio \pm E.S de cuatro mediciones. Se muestran los componentes del transporte de calcio saturable (línea punteada) y difusivo (línea raya-punto-rama), calculados a partir del transporte total medido.



Células duodenales aisladas

Las células intestinales aisladas mostraron altos índices de viabilidad, medidos por la exclusión del colorante Trypan blue, resultando un promedio de células viables de $96 \pm 2\%$. La actividad de la enzima sucrasa en la suspensión celular fue de $30,92 \pm 0,66$ U./mg proteínas (C.V 4,25%), valor aún más alto, expresado en las mismas unidades, que el reportado por Lee y col. (12). Estos resultados junto con la observación microscópica de las células permiten concluir que las suspensiones celulares obtenidas fueron mayoritariamente células epiteliales viables absorptivas maduras.

En la figura 2 se muestran los resultados de la captación de calcio. El valor de nuestro control de $9,32 \pm 2,16$ nmol calcio/mg proteínas ($n = 6$) estuvo dentro del rango reportado tanto por Piccotto y col. (9) como por Arjmandi y col. (23).

El agregado de A23187 al medio produjo un significativo incremento en la captación de calcio comparado con el control. Por el contrario, la presencia de nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio tipo L dependientes del voltaje (24), a una concentración de $10 \mu\text{M}$, disminuyó significativamente la captación de ^{45}Ca .

Sacos intestinales evertidos

En la figura 3 se muestran los flujos de calcio mucoso-seroso aparentes en sacos duodenales evertidos de rata, determinados en aerobiosis y microoxia. La incubación con burbujeo de N_2 a 0°C (microoxia) produjo una reducción significativa del flujo aparente de calcio. El valor obtenido del flujo de calcio aparente en aerobiosis (con burbujeo de

carbógeno) fue similar al informado por Adler y col. (4). El caudal de agua a través de la pared intestinal de los sacos incubados en aerobiosis fue en promedio de $0,060 \pm 0,009$ ml/hr ($n=12$).

Las pruebas de viabilidad mostraron que la concentración de glucosa del medio mucoso decayó de una manera lineal hasta los 30 minutos de incubación,

con una pendiente negativa de $1,87 \pm 0,15$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido húmedo ($n=8$, $R^2 = 0,997$). La actividad de fosfatasa alcalina en el medio mucoso fue menor de $1,40 \pm 0,41$ U.I (a 30°C)/g tejido húmedo ($n=8$) a los 45 minutos. No se observaron cambios histológicos en los segmentos intestinales después de la incubación, comparados con el tiempo cero.

Figura 2. Captación de calcio por enterocitos aislados de pollo, expresado como nmol Ca/mg proteínas, en presencia de A23187 y nifedipina. Todos los datos son promedio \pm E.S de $n=6$ mediciones. * $P < 0,05$ vs. control.

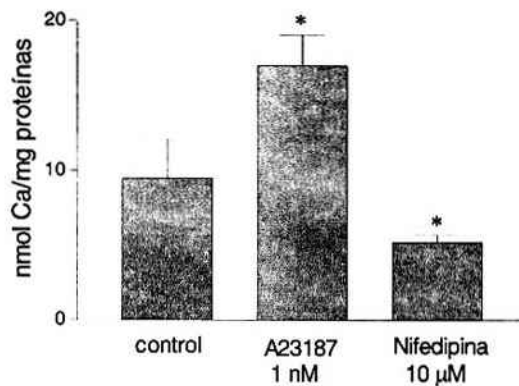
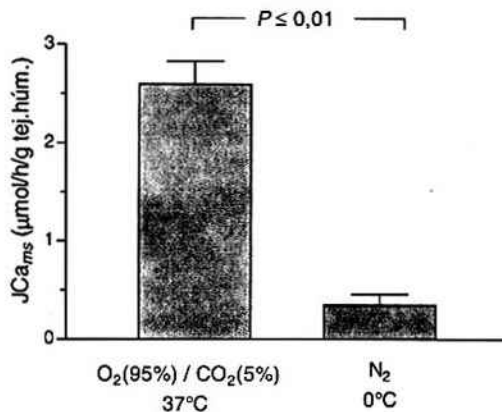


Figura 3. Flujo de calcio mucoso-seroso aparente ($J\text{Ca}_{ms}$) en sacos duodenales evertidos de ratas Wistar machos, medido en condición de aerobiosis ($\text{O}_2(95\%)/\text{CO}_2(5\%)$ a 37°C) y microxia (N_2 a 0°C). Datos son promedio \pm E.S de $n=8$ mediciones.



Conclusiones

Las especies animales más usadas como modelo de estudio del metabolismo del calcio son la rata y el pollo (1,3). Por lo tanto resultó imprescindible contar con técnicas confiables para la realización de nuestro trabajo de investigación centrado en estudiar los mecanismos de absorción intestinal del calcio en estas especies. Los métodos ensayados que utilizan radiocalcio *in vitro* e *in vivo* fueron ajustados de manera satisfactoria.

La técnica de segmentos intestinales ligados *in situ* resultó de baja complejidad técnica y permitió medir el transporte de calcio en una situación lo más cercana a la fisiológica. Como contrapartida se necesitó un mayor número de animales para obtener los parámetros, con un nivel estadísticamente aceptable.

La obtención de células duodenales aisladas implicó un proceso más laborioso, y de mayor complejidad técnica. Las condiciones experimentales pudieron acotarse perfectamente, y como lo muestran los resultados, resultó útil para analizar la influencia de diversas drogas sobre la entrada del calcio en el enterocito. El ionóforo A23187 produjo específicamente la apertura de los canales epiteliales de calcio tendiendo a equiparar las concentraciones de calcio a ambos lados de la membrana de la microvellosidad, ocasionando por lo tanto una masiva entrada de ^{45}Ca en el enterocito (24), explicando el aumento observado en la captación de Ca.

La limitación del método de los sacos intestinales evertidos en relación con la pérdida de viabilidad del tejido con el paso del tiempo, se trató de evitar reduciendo el tiempo de la incubación, de 1-2 horas (2,4) a 45 minutos, logrando mantener el tejido en buenas condiciones durante la medición del flujo aparente de calcio y sin afectar la calidad de los resultados. Los datos de las pruebas de viabilidad permiten concluir que las preparaciones intestinales *in vitro* se mantuvieron viables y sin alteraciones estructurales importantes durante los ensayos. El transporte de calcio medido con esta técnica es dependiente de la energía metabólica. Esta aseveración esta avalada por el hecho de que la incubación en condiciones de microxia, donde los procesos metabólicos celulares se encuentran prácticamente inhibidos (2,4,5), redujo significativamente el valor del flujo aparente de Ca. Si bien en microxia no habría nueva síntesis de ATP, aún así podría existir un

reservorio intracelular de ATP capaz de mantener algún proceso activo de transporte. Sin embargo, la extrusión de Ca a través de la membrana basolateral hacia el compartimento extracelular es el único paso del transporte transcelular de calcio dependiente del ATP (intercambiador Na/Ca, bomba de Ca), y su improbable funcionamiento en microxia (2) no alcanzaría para sostener un transporte intestinal activo de Ca. El pequeño flujo aparente de Ca obtenido en estas condiciones se debería entonces más probablemente a una difusión bidireccional del calcio por un efecto de acoplamiento con el flujo de agua (2).

Los métodos presentados aquí permitieron evaluar el proceso de la absorción intestinal de calcio de manera global, obteniéndose parámetros de una gran significación fisiológica, que resultaron coherentes con los reportados en la bibliografía. Estas técnicas pueden ser utilizadas tanto para estudiar nuevos aspectos relacionados con la regulación fisiológica, como los posibles efectos adversos de sustancias potencialmente tóxicas para los organismos vivos superiores y que actúen alterando el metabolismo del calcio.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo en parte con fondos del proyecto C.A.I+D 2000 20-T.I 13-programa 1, Universidad Nacional del Litoral. Agradecemos al Dr. Gerardo Pisani (U.N.R) por los estudios de microscopía óptica. Los pollos utilizados fueron generosamente provistos por la empresa Agroveterinaria Garay S.A (Recreo, Santa Fe). La Bioquímica Verónica Meichtry realiza una pasantía de investigación para graduados dentro del mencionado proyecto.

Bibliografía

- 1- Bronner, F. and Pansu, D. 1999. Nutritional aspects of calcium absorption. *J.Nutr.* **129**, 9-12.
- 2- Bronner, F., Pansu, D., Stein, W.D. 1986. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am. J. Physiol.* **250**, G561-G569.
- 3- Hoenderop, J.G., Muller, D., van Os, C.H., Vennekens, B.N., Bindels, R.J. 2000. The epithelial calcium channel, ECaC, functions as gate-keeper of active calcium (re)absorption. In: *Vitamin D endocrine system. Structural, biological, genetic and*

- clinical aspects*. pp 633-640. Eds. A.W. Norman, R. Bouillon and M. Thomasset. Riverside, USA.
- 4- Adler, A.J., Zara, C. and Berlyne, G.M. 1989. Effect of aluminum on bidirectional calcium flux in rat everted intestinal sacs. *Am. J. Physiol.* **257**, G433-G437.
- 5- Kararli, T.T. 1989. Gastrointestinal absorption of drugs. In: *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers Systems* **6(1)**, 39-86. CRC Press, Inc.
- 6- Pansu, D., Bellaton, C., Roche, C., and Bronner, F. 1983. Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D. *Am. J. Physiol.* **244**, G695-G700.
- 7- Schleiffer, R., Galluser, M., Rohr, O., and Raul, F. 1993. Development of a technique for in situ studies of calcium absorption in the intestine of rats. *Biomed. Pharmacother.* **47(1)**, 19-23.
- 8- Liang, C.T., Barnes, J., Takamoto, S., Sacktor, B. 1989. Effect of age on calcium uptake in isolated duodenum cells: role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* **124(6)**, 2830-2836.
- 9- Picotto, G., Massheimer, V., Boland, R. 1997. Parathyroid hormone stimulates calcium influx and the cAMP messenger system in rat enterocytes. *Am. J. Physiol.* **273**, C1349-C1353.
- 10- Orihuela, D. 1999. Tesis Doctoral: "Diferencias ligadas al sexo en el efecto del aluminio sobre el transporte intestinal de calcio en la rata", capítulo II, pág. 33, Fac. Bioq. Cs. Biol., UNL.
- 11- Hudson, L., Hay, F.C. 1980. *Practical Immunology, second edition*, chapter 2, pp 29-31, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 12- Lee, E.A., Weiss, S.L., Lam, M., Torres, R., Diamond, J. 1998. A method for assaying intestinal brush-border sucrase in an intact intestinal preparation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 2111-2116.
- 13- Gornall, A.G., Bardawill, C. and David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- 14- Vivaudou, M.B., Arnoult, C., Villaz, M. 1991. Skeletal muscle ATP-sensitive K⁺ channels recorded from sarcolemmal blebs of split fibers: ATP inhibition is reduced by Mg²⁺ and ADP. *J. Membr. Biol.* **122**, 165-175.
- 15- Carrillo, M.C., Monti, J.A., Grosman, M.E and Rodríguez Garay, E.A. 1985. Effect of pH on aflatoxin B1 transfer in the everted rat jejunum. *Toxicol. Lett.* **27**, 35-44.
- 16- Kimura, S., Totani, M. And Murachi, T. 1973. Indices of viability of isolated intestines: glucose uptake and release of enzymes. *Japan. J. Exper. Medic.* **43**, 163-177.
- 17- Tietz, N.W. 1970. *Fundamentals of Clinical Chemistry*, pp. 154, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 18- Bowers, G.N. and Mc Comb, R.B. 1966. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin.Chem.* **12**, 70-71
- 19- Caro, R.A., Ciscato, A., Piccini, Z.F. 1974. Interacción de las partículas o radiaciones con la materia. En: *Metodología de radioisótopos en el laboratorio moderno*, pp 58-59. Ed. Panamericana, Buenos Aires.
- 20- Caro, R.A., Ciscato, A., Piccini, Z.F. 1974. Manipulación sin riesgo del material radiactivo. En: *Metodología de radioisótopos en el laboratorio moderno*, pp 79-80. Ed. Panamericana, Buenos Aires.
- 21- Motulsky, H. 1995. *Intuitive biostatistics*. Oxford University Press, New York, USA.
- 22- GraphPad InStat/Prism® version 3.02, *Users Guide*. 2000. GraphPad Software Inc., San Diego, USA.
- 23- Arjmandi, B.H, Salihi, M.A, Herbert, D.C, Sims, S.H and Kalu, D.N. 1993. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. *Bone Miner.* **21**, 63-74.
- 24- Peng, J., Chen, X., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Tsukaguchi, H., Brown, E.M., Hediger, M.A. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J.Biol.Chem.* **274**, 22739-22746.