

Relación entre la especiación química del aluminio, analizada por espectroscopía FT-IR, y su efecto tóxico sobre el transporte intestinal de calcio *in vitro*

Orihuela, Daniel*; Perin, Juan C.**; Meichtry, Verónica*

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

** - Departamento Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Correspondencia a: Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina

Fax: + 54-342-4575221; e-mail: orihuela@lbcn.unl.edu.ar

RESUMEN: Con el objetivo de analizar si la especiación química del aluminio (Al) influye en su efecto tóxico, se midió el transporte de ^{45}Ca (JCa) usando un modelo *in vitro* de segmentos evertidos de intestino delgado de pollo, en presencia de diferentes compuestos de Al, inorgánicos: AlF_3 , AlCl_3 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, y orgánicos: Al-citrato (CAI), Al-maltol (MAI), Al-lactato (LAI), a concentraciones nominales del orden micromolar a pH fisiológico. Para caracterizar las especies químicas de Al se obtuvieron los espectros FT-IR (*Fourier transformed infrared*) de los compuestos liofilizados en ausencia y presencia de calcio. Todos los compuestos de Al ensayados disminuyeron el transporte intestinal de calcio, aunque las gráficas JCa, expresado como % del control, en función de $\log [\text{Al}]$ mostraron diferentes formas. CAI presentó una relación lineal. Para $\text{Al}(\text{OH})_3$ no hubo relación con la $[\text{Al}]$. AlF_3 , AlCl_3 , MAI y LAI mostraron curvas dosis-respuesta sigmoideas tipo *downhill*, con similares valores del % máximo de inhibición ($I_{\text{max}} \sim 40\%$) pero distintos IC_{50} ($[\text{Al}]$ que produce la mitad de I_{max}), en μM : $\text{AlCl}_3 = 99,8 \pm 0,4$, $\text{AlF}_3 = 59,4 \pm 0,3^*$, $\text{MAI} = 94,2 \pm 0,5$, $\text{LAI} = 86,6 \pm 0,6^*$; $^*P < 0,05$ vs. AlCl_3 . Los resultados sugieren que *in vitro* la acción del Al sobre el transporte intestinal de calcio sería dependiente de la especiación química del metal, con un efecto inhibitorio relativo $\text{AlF}_3 > \text{LAI} > \text{AlCl}_3 = \text{MAI} > \text{CAI} > \text{Al}(\text{OH})_3$, la cual condicionaría su biodisponibilidad y probablemente su mecanismo molecular de acción tóxica.

Palabras clave: aluminio, calcio, intestino delgado, FT-IR.

SUMMARY: Relationship between chemical speciation of aluminium, analyzed by FT-IR spectroscopy, and its toxic effect on *in vitro* intestinal calcium transport. Orihuela, Daniel; Perin, Juan Carlos; Meichtry, Verónica.

In order to analyze whether aluminium (Al) chemical speciation is related to its toxic effect, ^{45}Ca transport (JCa) was measured using an *in vitro* model of chicken small intestine everted segments in the presence of different Al chemical forms, inorganic ones: AlF_3 , AlCl_3 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, and organic ones: Al-citrate (CAI), Al-maltol (MAI), Al-lactate (LAI), at micromolar concentrations and physiological pH. To identify Al chemical species, FT-IR (*Fourier Transformed Infrared*) spectra of lyophilized Al compounds with and without calcium, were obtained. All assayed Al compounds decreased intestinal calcium transport, although JCa (as % of control) vs. $\log [\text{Al}]$ plots showed different shapes. CAI presented a linear relationship. $\text{Al}(\text{OH})_3$ was not related to $[\text{Al}]$. AlF_3 , AlCl_3 , MAI and LAI showed sigmoid downhill dose-response curves with similar I_{max} values (highest inhibition $\sim 40\%$) but different IC_{50} ($[\text{Al}]$ that produces half of I_{max}), in μM : $\text{AlCl}_3 = 99,8 \pm 0,4$, $\text{AlF}_3 = 59,4 \pm 0,3^*$, $\text{MAI} = 94,2 \pm 0,5$, $\text{LAI} = 86,6 \pm 0,6^*$; $^*P < 0,05$ vs. AlCl_3 . These results suggest *in vitro* action of Al on intestinal calcium transport would be dependent on metal chemical speciation, with a relative inhibitory effect: $\text{AlF}_3 > \text{LAI} > \text{AlCl}_3 = \text{MAI} > \text{CAI} > \text{Al}(\text{OH})_3$, which would limit its bioavailability and probably its molecular mechanism of toxic action.

Keywords: aluminium, calcium, small intestine, FT-IR.

Introducción

El aluminio (Al) es un metal tóxico para los seres vivos, y en individuos sanos la principal ruta de acceso al organismo es la vía oral, a través de diversas fuentes como medicamentos de uso corriente conteniendo compuestos de Al, aditivos alimentarios, elementos de cocina, agua corriente (1). En el lumen intestinal el Al puede reaccionar con diversos componentes dietarios produciendo una gran variedad de especies químicas (2,3,13).

Nota:

Partes de este trabajo fueron presentadas en la XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, 20-23 de noviembre de 2002, Mar del Plata, Argentina.

Recibido: 30-06-03

Aceptado: 18-09-03

La toxicidad del Al dependería de su biodisponibilidad, a su vez relacionada con la especiación química del metal en los distintos medios biológicos (fluido intestinal, plasma sanguíneo) (4). En el intestino el efecto tóxico dependería de la interacción del Al con elementos del glicocalix y el mucus, así como de la presencia de diferentes compuestos químicos (ligandos) provenientes de los alimentos ingeridos (e.g: ácido cítrico), que podrían favorecer su absorción (5, 14, 15).

Se sabe que el aluminio reduce el transporte intestinal de calcio, afectando sobre todo la vía transcelular de la absorción (entrada, transporte celular desde el polo apical al polo basal del enterocito y extrusión) en las primeras porciones del intestino delgado, tanto en humanos como en ratas y pollos (6). En trabajos previos hemos demostrado que la presencia de silicatos en la luz intestinal puede atenuar este efecto nocivo del Al (7).

Por lo tanto el conocimiento de la especiación química del metal en el medio intestinal puede ayudar a encontrar acciones terapéuticas adecuadas para controlar su toxicidad.

El objetivo del presente trabajo fue analizar comparativamente el efecto de diferentes compuestos químicos de Al, tanto inorgánicos como orgánicos, sobre el transporte de calcio en intestino delgado de pollo *in vitro* para buscar posibles correlaciones entre el efecto tóxico del Al con la especiación química.

Materiales y Métodos

Preparación de las soluciones de aluminio

Se utilizaron tres compuestos inorgánicos: AlF_3 , $AlCl_3$, $Al(OH)_3$, y tres orgánicos: Al-citrato (CAI), Al-maltol (MAI), Al-lactato (LAI). A los fines de facilitar la comprensión se mantendrá esta nomenclatura de los compuestos de Al a lo largo del trabajo, aunque es válido recalcar que la química del ión aluminio en solución acuosa es muy compleja, formándose una gran variedad de especies químicas hidroxiladas de composición variable en presencia de distintos ligandos (12). Se prepararon soluciones de concentración nominal 0,1 M de cada compuesto, en buffer Tris-ClH 0,1 N de pH 7,3 (a 25 °C), siguiendo el proto-

colo estándar descrito por Tapparo y col. (8). CAI, MAI, LAI y AlF_3 , se obtuvieron mezclando los ligandos (citrato sódico, maltol, lactato sódico y fluoruro sódico, respectivamente) con $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ en la proporción 1,3:1, para prevenir la hidrólisis del Al (comunicación personal del Dr. Robert Yokel). Todas las drogas usadas fueron de calidad pro-análisis (Sigma Co. y Mallinckrodt).

Obtención de los espectros FT-IR

Una alícuota de 5 ml de cada solución preparada como se indicó antes, fue liofilizada en un equipo de liofilización. El residuo sólido obtenido se mezcló con BrK en la proporción 1:20 (p/p) (5), y por compactación se obtuvo una pastilla que se colocó en el compartimento de muestras del equipo. Se obtuvieron los espectros FT-IR entre las longitudes de onda 400 y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} (4 scans), en un equipo Perkin Elmer Spectrum RX II / FT-IR.

Los espectros originales fueron procesados con el software *ad hoc* del equipo, realizándose una corrección automática de línea de base y posterior normalización de los espectros. Los espectros fueron analizados para identificar las longitudes de onda de los picos encontrados.

Cuantificación del efecto del Al sobre el transporte intestinal de calcio

La elección de un modelo *in vitro* respondió a la necesidad de obtener información preliminar dada la complejidad del fenómeno que permita abordar el estudio *in vivo* con más éxito. Se midió el transporte de calcio mucoso-seroso (JCa_{ms}), usando 2 $\mu Ci/ml$ de $[^{45}Ca]Cl_2$ (NEN Dupont, USA) como marcador, agregados a 1 mM de $CaCl_2$ total "frío", en sacos duodenales evertidos de pollo *in vitro* (9) en presencia de Al, bajo las formas químicas antes indicadas, a las siguientes concentraciones nominales: 2, 20, 100 y 200 μM . Los controles sin Al fueron incubados con los respectivos ligandos. Se utilizó el promedio de $n = 4$ mediciones para cada compuesto y concentración.

Para cada compuesto de Al se analizaron las relaciones dosis-respuesta graficando el JCa_{ms} , expresado como % del control sin Al, en función del log [Al].

Análisis de los datos

Las curvas dosis-respuesta sigmoideas se obtuvieron por un método de ajuste no-lineal y se compararon por análisis de covarianza. La regresión lineal se realizó por el método de los cuadrados mínimos. El nivel de significación fue fijado en 0,05 para todas las comparaciones. Los datos fueron procesados con una versión registrada del programa Prism 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

En la figura 1 se muestran las relaciones entre el transporte intestinal de calcio, como % del control, y la concentración de Al en el medio de incubación. Todos los compuestos de Al ensayados disminuyeron el JCa, aunque las curvas dosis-respuesta tuvieron distintas formas. $AlCl_3$, AlF_3 , LAI y MAI mostraron una curva dosis-respuesta sigmoidea tipo *downhill*. Como se observa en la tabla 1, los valores de I_{max} (máxima reducción de JCa) fueron similares (~ 40 %), pero se hallaron diferencias significativas en IC_{50} (concentración de Al que produce la mitad de I_{max}) de AlF_3 y LAI, comparados con $AlCl_3$.

Para CAI la relación resultó ser lineal ya que la gráfica se ajustó mejor a una recta de pendiente negativa: $y = 84,82 - 0,108x$, $r^2 = 0,651$, $P = 0,023$.

Por el contrario el $Al(OH)_3$ produjo una pequeña reducción del JCa que no presentó una definida tendencia a variar con la concentración de Al.

En las figuras 2 y 3 se presentan los espectros FT-IR, expresados en unidades de absorbancia en función de la longitud de onda (en 1/cm), de los compuestos de Al orgánicos (Al-citrato, Al-lactato, Al-maltol) e inorgánicos (AlF_3 , $AlCl_3$, $Al(OH)_3$), respectivamente. En las mismas figuras se muestran superpuestos los espectros de los compuestos de Al obtenidos en presencia de $CaCl_2$. Se puede observar que los compuestos inorgánicos de Al y el Al-lactato mostraron marcados corrimientos de los picos de los espectros FT-IR en presencia de calcio, especialmente en la zona de longitudes de onda 2.200 a 3.500 cm^{-1} .

La tabla 2 muestra la posición en longitud de onda (1/cm) correspondiente a los principales picos de los espectros FT-IR de todos los compuestos analizados.

Discusión y conclusiones

El principal hallazgo de la investigación realizada es que *in vitro* la acción del Al sobre el transporte intestinal de calcio es dependiente de la especie química del metal. La especiación química del Al en soluciones acuosas en presencia de ligandos inorgánicos y orgánicos condicionaría su biodisponibilidad y probablemente también el mecanismo molecular de acción tóxica del metal (2). Del análisis de las curvas dosis-respuesta y de los parámetros IC_{50} (menor valor significa mayor efecto inhibitorio sobre el JCa) se puede concluir que la capacidad inhibitoria relativa de los compuestos de aluminio ensayados fue: $AlF_3 > LAI > AlCl_3 = MAI > CAI > Al(OH)_3$. Estas diferencias en el grado de efecto pueden ser atribuidas a la diferente especiación, constantes de disociación y lipofilidad de los compuestos de Al formados.

El Al puede afectar el transporte intestinal de Ca por la vía transcelular a distintos niveles. Competiendo directamente por los canales epiteliales situados sobre la microvellosidad del enterocito que introducen el Ca desde el lumen, o bien produciendo alteraciones en la membrana que indirectamente pueden alterar la funcionalidad de los canales. Competiendo por los sitios de unión de las proteínas citosólicas transportadoras de Ca (calbindin-D28k, calmodulina) o inhibiendo la síntesis de estas proteínas. Asimismo podría afectar los sistemas de extrusión de Ca sobre la membrana basolateral (Ca-ATPasa, intercambiador Na/Ca).

El AlF_3 mostró el mayor efecto inhibitorio sobre el JCa. En experimentos realizados con multicapas fosfolípidicas *in vitro* este compuesto, que al pH fisiológico se encuentra principalmente como complejo fluoroaluminato (AlF_4^-), demostró poder interactuar con los fosfatos del grupo de cabeza polar, un efecto que puede alterar diversas operaciones bioquímicas de la membrana (2), que incluyen modificación de los transportes iónicos y activación de las cascadas que involucran las proteínas-G, GMP

Figura 1: Curvas dosis-respuesta del efecto del aluminio, en las diferentes formas químicas probadas, sobre el transporte mucoso-seroso de ^{45}Ca (JCa_{ms}) en intestino delgado de pollo, expresadas como % del control sin aluminio en función del logaritmo de la concentración nominal de aluminio. *Panel A:* compuestos inorgánicos de Al. *Panel B:* compuestos orgánicos de Al.

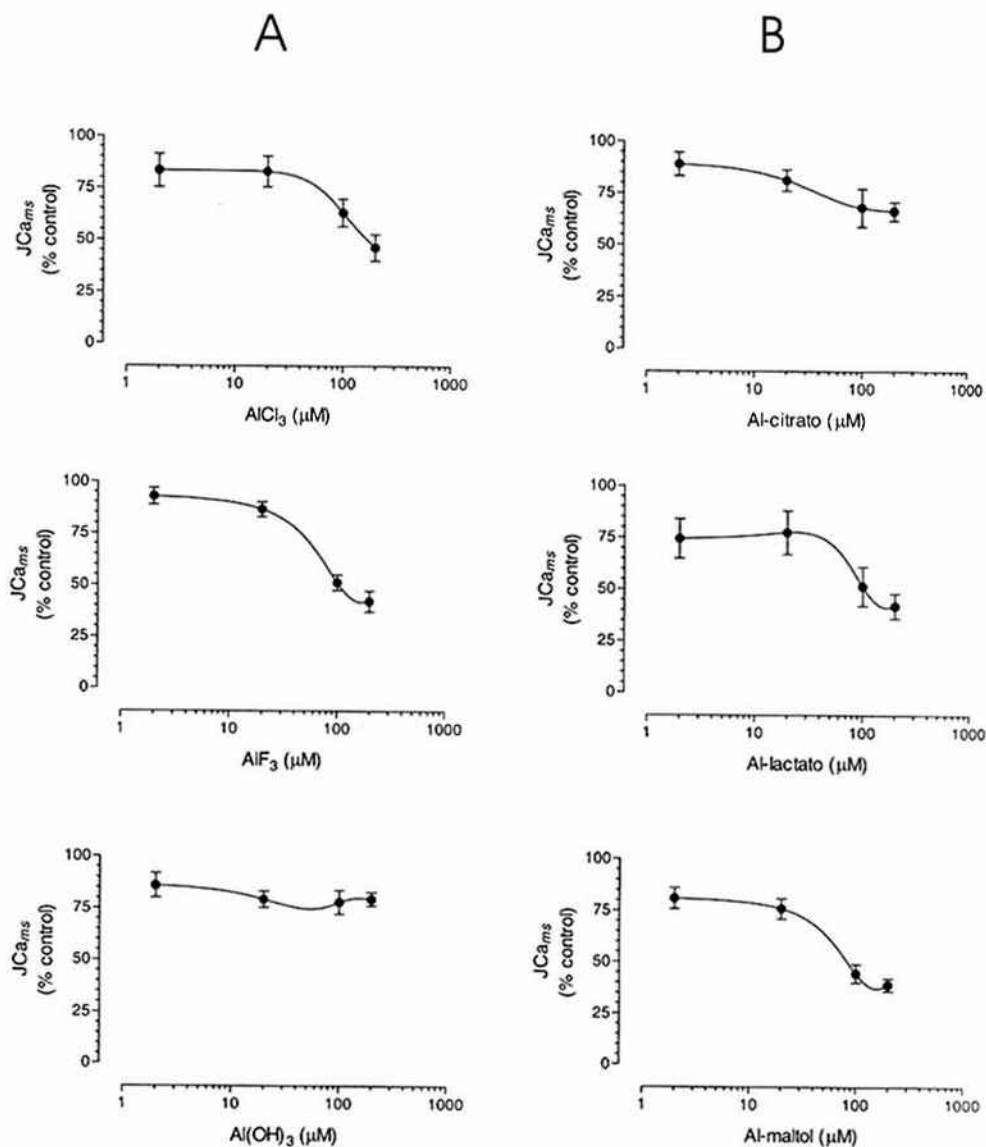


Figura 2. Espectros FT-IR de los compuestos orgánicos de aluminio, obtenidos solos (línea llena) y en presencia de 1 mM CaCl_2 (línea punteada). (A) Al-citrato (B) Al-lactato (C) Al-maltol

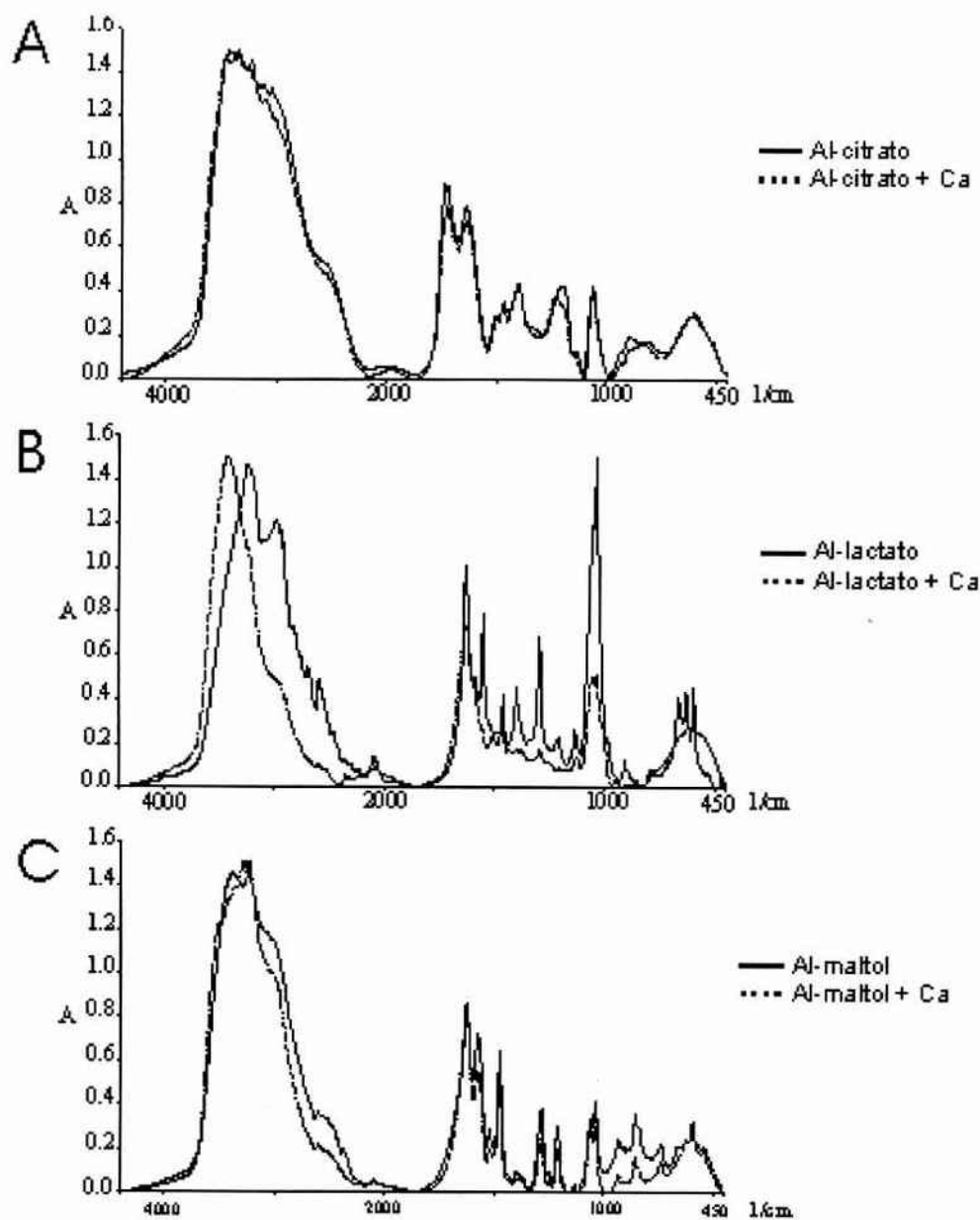
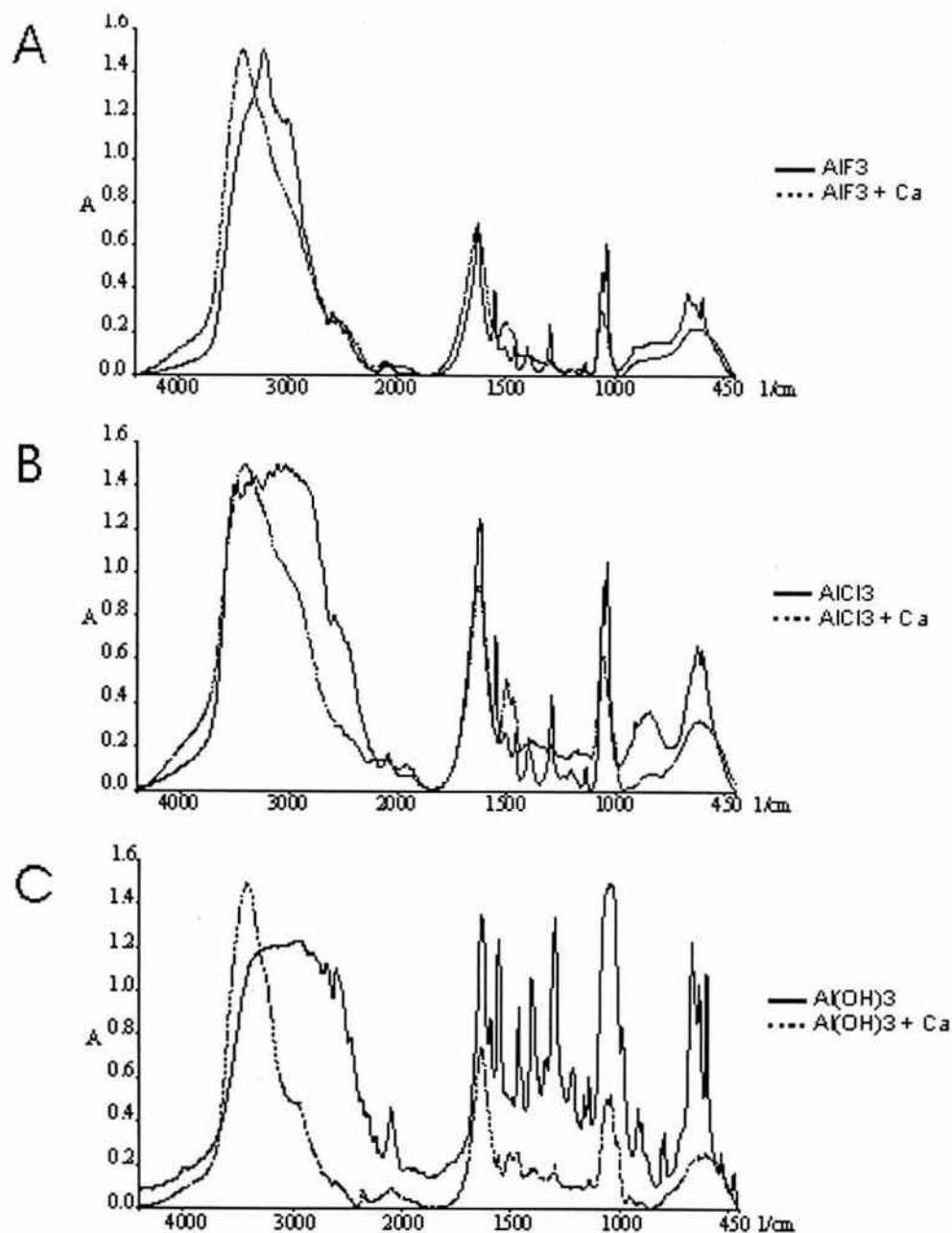


Figura 3. Espectros FT-IR de los compuestos inorgánicos de aluminio, solos (línea llena) y en presencia de 1 mM CaCl_2 (línea punteada). (A) AlF_3 (B) AlCl_3 (C) $\text{Al}(\text{OH})_3$



cíclico y proteínas kinasas C y A, ocasionando la disrupción de las señales intracelulares de calcio. Ha sido reportado que el complejo AlF_4^- puede unirse a enzimas que se encuentran sobre el lado citoplasmático de la membrana, como la Ca-ATPasa, inhibiendo su actividad (12).

Se ha demostrado que el $AlCl_3$ induce importantes desordenes a nivel molecular en la bicapa lipídica de las membranas celulares (2), explicando en parte su efecto deletéreo sobre el JCa intestinal. Por otra parte se ha reportado que esta sal de Al puede reducir el nivel intestinal de calbindin-D28k en pollos, inhibiendo su síntesis (16).

Los compuestos que produjeran una mayor concentración de Al libre en solución, aumentando la biodisponibilidad, resultarían más perniciosos. Sin embargo, el citrato que favorece la solubilización del Al (12), tuvo un poder inhibitorio del JCa transcelular relativamente bajo. Esto podría deberse a que a pH neutro, forma principalmente especies aniónicas de Al (15) que son transportadas por vía paracelular.

El escaso efecto del $Al(OH)_3$ sobre el JCa podría explicarse por la muy baja solubilidad de este compuesto en agua a pH 7,3, existiendo una gran discrepancia entre la concentración nominal y la concentración efectiva real, siendo ésta unas 1000 veces menor (12).

Estudios futuros tenderán a identificar y cuantificar especies químicas de aluminio en el fluido intestinal utilizando una metodología FT-IR, para encontrar modos eficaces de neutralizar la toxicidad del metal, bloqueando una de las principales vías de acceso al organismo. Asimismo, estos datos permitirán determinar la validez de las simulaciones computacionales de la especiación química de aluminio (10,11), como herramienta teórica de análisis.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con un subsidio de la Universidad Nacional del Litoral (proyecto C.A.I+D 2000 20-TI-13), otorgado a DO. Agradecemos al Bioq. Miguel A. Barrios (CIEN, FBCB-UNL) por el uso del equipo de liofilización.

Bibliografía

- Goyer, R.A. 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu.Rev.Nutr.* **17**, 37-50
- Suwalsky, M., Norris, B., Kiss, T., Zatta, P. 2002. Effects of Al(III) speciation on cell membranes and molecular models. *Coord.Chem.Rev.* **228**, 285-295
- Perry, C.C., Shafran, K.L. 2001. The systematic study of aluminium speciation in medium concentrated aqueous solutions. *J.Inorg.Biochem.* **87**, 115-124
- Shuping, B., An, S., Tang, W., Xue, R., Wen, L., Liu, F. 2001. Computer simulation of the distribution of aluminium speciation in soil solutions in equilibrium with the mineral phase imogolite. *J.Inorg.Biochem.* **87**, 97-104.
- Elkins, K.M., Nelson, D.J. 2001. Fluorescence and FT-IR spectroscopic studies of Suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium. *J.Inorg.Biochem.* **87**, 81-96.
- Orihuela, D., Carnovale, C.E., Monti, J.A. and Carrillo, M.C. 1996. Sex-related differences in the effect of aluminum on calcium transport in the small intestine of the rat. *Toxicol. Lett.* **85**, 165-171.
- Orihuela, D., Meichtry, V. 2000. Efectos combinados del aluminio y del silicio sobre la captación de calcio in vitro por enterocitos aislados de pollo. *Medicina (Bs.As.)* **60**, 805-806.
- Tapparo, A., Solda, L., Bombi, G.G., Zambenedetti, P., Zatta, P.F., Bertani, R., Corain, B. 1995. Analytical validation of a general protocol for the preparation of dose-controlled solutions in aluminium toxicology. *The Analyst* **120**, 2425-2429.
- Meichtry, V., Orihuela, D. 2002. Desarrollo y aplicación de métodos radioisotópicos para medir la absorción intestinal de calcio en animales de experimentación. *FABICIB* **6**, 19-27.
- 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.
- May, P.M., Linder, P.W., Williams, D.R. 1977. Computer simulation of metal-ion equilibria in biofluids: models for the low-molecular-weight complex distribution of calcium (II), magnesium (II), manganese (II), iron (III), copper (II), zinc (II), and lead (II) ions in human blood plasma. *J.C.S. Dalton* **1**, 588-595.
- Harris, W.R., Berthon, G., Day, J.P., Exley, C., Flaten, T.P., Forbes, W.F., Kiss, T., Orvig, C. and Zatta, P.F. 1996. Speciation of aluminum in biological systems. *J.Toxicol. Environ. Health* **48**, 543-568.
- Partridge, N.A., Regnier, F.E., White, J.L. and Hem, S.L. 1989. Influence of dietary constituents on intestinal absorption

of aluminum. *Kidney Int.* **35**, 1413-1417.

14. Partridge, N.A., Regnier, F.E., Reed, W.M., White, J.L. and Hem, S.L. 1992. Contribution of soluble aluminium species to absorption of aluminium from the rat gut in situ. *Clinic. Sci.* **83**, 425-430.

15. Froment, D.P., Molitoris, B.A., Buddington, B., Miller, N. and Allfrey, A.C. 1989. Site and mechanism of enhanced gastrointestinal absorption of aluminum by citrate. *Kidney Int.* **36**, 978-984.

16. Dunn, M.A., Johnson, N.E., Liew, M.Y.B. and Ross, E. 1993. Dietary aluminum chloride reduces the amount of intestinal calbindin D-28K in chicks fed low calcium or low phosphorus diets. *J.Nutr.* **123**, 1786-1793.