

# Efecto del aluminio sobre la entrada apical de calcio en enterocitos aislados

Orihuela, D.\*; Meichtry, V.; Pizarro, M.

Laboratorio de Investigaciones Fisiológicas Experimentales, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.  
Universidad Nacional del Litoral

**RESUMEN:** Para estudiar el efecto del aluminio (Al) sobre la entrada apical de calcio (Ca) se utilizó un modelo de enterocitos aislados de pollo y se determinó la captación de radiocalcio (CaUPT) a concentraciones de Ca total variando entre 0,01 y 5 mM, en presencia de lactato de Al 100  $\mu$ M. El proceso se pudo describir con una ecuación hiperbólica tipo de saturación. El Al produjo una significativa disminución tanto de la captación máxima ( $15,3 \pm 1,9$  vs.  $22,1 \pm 3,4$  nmol Ca/mg prot.,  $P < 0,05$ ) como de la constante de afinidad ( $1,4 \pm 0,2$  vs.  $2,1 \pm 0,4$   $\mu$ M,  $P < 0,05$ ), comparado con el control. Las curvas dosis-respuesta, % reducción de CaUPT vs.  $\log [Al]$ , a  $[Al]$  variando entre 10-150  $\mu$ M, resultaron sigmoideas uphill, con un IC50 a pH 7,4 de  $30,1 \pm 2,3$   $\mu$ M. A pH 6,5 ocurrió una significativa reducción de IC50 ( $19,3 \pm 7,8$   $\mu$ M,  $P < 0,05$ ) sin modificación de  $I_{max}$  (55%). Estos parámetros fueron independientes de la vitamina D. La inhibición del Al sobre CaUPT fue anulada por bloqueadores de canales de Ca tipo L, incrementada significativamente por el ionóforo A23187 y aumentada ligeramente por capsaicina (estimulador de los canales epiteliales de Ca). Estos resultados sugieren que el Al es capaz de unirse a los distintos canales-transportadores de la membrana de la microvellosidad intestinal y competir con el Ca por los sitios activos.

**Palabras clave:** Aluminio; Captación de calcio; enterocitos.

**SUMMARY:** *Aluminium effect on apical calcium uptake in isolated enterocytes.* Orihuela, D.; Meichtry, V.; Pizarro, M.. To study the aluminium effect on calcium apical entry, a model of isolated chicken enterocytes was used. Radiocalcium uptake (CaUPT) at total Ca concentrations varying from 0.01 to 5 mM in the presence of 100  $\mu$ M Al-lactate, was determined. Process was compatible with a saturation type equation. Al produced a significant decrease in both maximum uptake rate ( $15.3 \pm 1.9$  vs.  $22.1 \pm 3.4$  nmol Ca/mg protein,  $P < 0.05$ ) and affinity constant ( $1.4 \pm 0.2$  vs.  $2.1 \pm 0.4$   $\mu$ M,  $P < 0.05$ ), as compared to control. The dose-response curves, % reduction of CaUPT vs.  $\log [Al]$ , at  $[Al]$  varying from 10 to 150  $\mu$ M, were S-shaped uphill, with a IC50 value, at pH 7.4, of  $30.1 \pm 2.3$   $\mu$ M. At pH 6.5, a significant decrease of IC50 value ( $19.3 \pm 7.8$   $\mu$ M,  $P < 0.05$ ) with no modification of  $I_{max}$  value (55%), was obtained. These parameters were independent of vitamin D. The inhibitory effect of Al on CaUPT was nullified by L-type Ca channel blockers, but significantly increased by ionophore A23187, and slightly augmented by capsaicin (an epithelial Ca channel activator). Our results suggest that Al is able to bind different Ca channels-transporters situated on intestinal microvilli membrane and to compete with Ca ions for the active sites.

**Key words:** *Aluminium; Calcium entry; enterocytes.*

---

## \* Correspondencia

Dr. Daniel Orihuela, LIFE-FBCB, Ciudad Universitaria,  
Paraje El Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina - Fax: +54-  
342-4575221; e-mail: orihuela@fbc.unl.edu.ar

## Nota

Partes de este trabajo fueron presentadas en la XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, 14 al 17 de noviembre de 2001, Mar del Plata, Argentina

## Introducción

El aluminio (Al) es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre y está ampliamente distribuido en el medio ambiente natural e industrial. Puede encontrarse en el agua corriente para consumo humano y en alimentos elaborados, como quesos, bizcochos y jugos, como un ingrediente natural o adicionado. Las fuentes de exposición son diversas, desde elementos de cocina y recipientes para alimentos fabricados con aluminio, antitranspirantes y cosméticos, hasta medicamentos vendidos sin prescripción, conteniendo aluminio en su composición, que son usados como antiácidos o antidiarreicos (1).

Algunos de los efectos reportados del Al sobre el metabolismo del calcio (Ca) incluyen: aumento de la excreción urinaria y fecal de Ca en hombres que consumen dietas con bajo contenido de Ca y que ingieren antiácidos que contienen Al; inhibición de la mineralización ósea; los compuestos de Al dietarios o sistémicos reducen la absorción intestinal de Ca dependiente de la vitamina D en ratas, pollos y humanos (2). En los estudios realizados por Adler y Berlyne (1985), y Adler y col. (1989) donde se evaluó el efecto del Al sobre la absorción intestinal de Ca en ratas normales, utilizando técnicas de sacos intestinales evertidos y dos radioisótopos,  $^{45}\text{Ca}$  y  $^{47}\text{Ca}$ , para medir el flujo bidireccional de calcio, se reporta que el Al en concentraciones micromolares significativamente inhibió la absorción neta en el duodeno a través de la reducción del flujo de Ca en el sentido mucoso-seroso (3,4). Dunn y col. (1993) y Cox y Dunn (2001), demostraron que el Al administrado con la dieta, redujo el contenido de la proteína calbindin-D28k en pollos disminuyendo su ARNm (5,6).

La vía transcelular de absorción de Ca por el enterocito comprende tres etapas: i) entrada del Ca atravesando la membrana de la microvellosidad; ii) movimiento intracelular desde el polo apical al basal y iii) extrusión atravesando la membrana basolateral (7,8). El efecto producido por el Al sobre el transporte intestinal de Ca transcelular podría ocurrir afectando cualquiera de estas tres etapas. Si bien se sabe que el Al afecta el movimiento de Ca dentro del enterocito, no es bien conocida su acción sobre la entrada y la extrusión del Ca. El reciente descubrimiento de ca-

nales-transportadores epiteliales de Ca, como el ECaC en riñón de conejo y el CaT1 en intestino de rata, ha revalorizado la importancia relativa de este paso (9,10). El Al podría modificar tanto la función como la regulación de estas proteínas y/o canales de Ca.

Puesto que el intestino es la principal ruta de entrada del metal en individuos sanos, la interacción a este nivel con el proceso de absorción de Ca resulta relevante, dado que esta etapa es crucial en la homeostasis general del Ca en el organismo.

El objetivo de este trabajo fue cuantificar el efecto del Al sobre la captación de calcio en un modelo de enterocitos aislados de pollo, utilizando métodos radioisotópicos.

## Materiales y métodos

### Modelo experimental

Los enterocitos fueron obtenidos del duodeno de pollos (*Gallus domesticus*) raza White Leghorn de 4 semanas de vida alimentados desde el hatching con alimento balanceado comercial (Agroveterinaria Garay SA, Santa Fe), mediante el tratamiento de la mucosa intestinal con hialurodinasa, de acuerdo al método descrito previamente en detalle (11-13). Se suspendieron en un medio conteniendo: manitol 240 mM,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  3 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  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. Se conservaron durante el tiempo que duraron los experimentos en baño Dubnoff a 37°C con agitación suave y en atmósfera de carbógeno (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ). Las células aisladas fueron caracterizadas por la medición de la actividad de la enzima sucrasa-isomaltasa, un marcador específico expresado por las células epiteliales maduras del intestino delgado (14), y mostraron índices de viabilidad >95%, medidos con la prueba del Trypan blue. La concentración celular se ajustó a  $\sim 1 \times 10^7$  células viables/ml. La concentración de proteínas se determinó por el método de Gornall modificado (15) usando albúmina sérica bovina 5 mg/ml como testigo.

### Tratamiento con aluminio

Las suspensiones celulares (200  $\mu\text{l}$ ) fueron incubadas durante 1 h con lactato de Al a una concen-

tración final efectiva en el medio de incubación de 10, 20, 50, 100, 125 y 150  $\mu\text{M}$ . Los controles fueron incubados con lactato sódico. Las soluciones de Al se prepararon siguiendo el protocolo estándar (16). Las concentraciones de Al se determinaron por espectroscopía de absorción atómica electrotrémica en un equipo Perkin Elmer modelo 5000 con horno de grafito modelo HGA-500 (USA).

#### **Cinética de captación de $^{45}\text{Ca}$**

Se utilizaron concentraciones de Ca total en el medio de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 y 5 mM. Se ensayó una concentración de Al 100  $\mu\text{M}$ . Luego de agregar a cada tubo 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{45}\text{CaCl}_2$  (NEN Dupont, USA), se incubó por 5 min. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La captación se bloqueó con 1,5 ml de *solución de paro* fría conteniendo KCl 140 mM, HEPES 10 mM, EGTA 2 mM,  $\text{LaCl}_3$  1 mM, pH 7,4 a 25 °C, 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 (12). Se midió la actividad de  $^{45}\text{Ca}$  del pellet solubilizado y de una alícuota del medio de captación inicial, en un detector de radiación beta (Alfa Nuclear, Argentina). Los resultados se expresaron en nmol de Ca/mg proteína celular (CaUPT).

#### **Efecto del pH**

Las curvas dosis-respuesta para el Al fueron obtenidas a pH 7,4 y a pH 6,5, a una concentración de Ca total en el medio de 1 mM.

#### **Influencia de la vitamina D**

Se realizaron pruebas de dosis-respuesta para el Al in vitro, usando enterocitos aislados de animales que recibieron una dieta sin vitamina D y que fueron tratados con etano-1-hidroxi-1,1-difosfonato (inhibidor de la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$ ) en dosis de 10 mg/kg peso corporal/día o.g durante la semana previa a la disección del intestino (4).

#### **Tratamiento con bloqueadores y estimuladores de canales de Ca**

Se analizó la influencia de diferentes drogas que actúan sobre los canales y/o los movimientos intracelulares de Ca, en el efecto producido por el Al

sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}$ . Las células fueron pretratadas desde 30 min antes del agregado de 100  $\mu\text{M}$  Al con: 10  $\mu\text{M}$  nifedipina, 10  $\mu\text{M}$  diltiazem, 1  $\mu\text{M}$  calcimicina (A23187), 1 nM U73122, o 20  $\mu\text{M}$  capsaicina. Los respectivos controles fueron incubados con vehículo (dimetilsulfóxido). La concentración de Ca total fue 1 mM.

#### **Pruebas de viabilidad**

Para evaluar el efecto de las condiciones de incubación sobre la viabilidad de los enterocitos aislados, se determinaron las actividades de lactato-deshidrogenasa (LDH), enzima citosólica (17), y de fosfatasa alcalina (ALP), enzima de brush border (18), en el medio de incubación a tiempo 0, 1 h y 2 h (tiempo máximo usado en los experimentos). Los resultados se expresaron como % respecto de las actividades enzimáticas del lisado celular.

#### **Estadística**

Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar de la media. Los promedios de dos grupos se compararon con 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. Las curvas de cinética de captación de Ca y dosis-respuesta del Al se obtuvieron mediante un método de ajuste no-lineal. El nivel de significación se fijó en 0,05 para todas las comparaciones. El procesamiento de los datos se realizó con una versión registrada del programa InStat/Prism v3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### **Resultados**

Los parámetros de viabilidad mostraron que tanto la actividad de LDH como de ALP sufrieron un muy pequeño incremento en el medio de incubación a las 2 h, siendo  $< 0,01\%$  y  $< 0,5\%$  de la actividad enzimática celular total, respectivamente; indicando que las condiciones de incubación fueron apropiadas y no ocasionaron daños celulares significativos.

En la figura 1 se muestran las curvas de CaUPT en función de la concentración de Ca total del medio, en enterocitos tratados con Al-lactato 100  $\mu\text{M}$  comparados con los controles tratados con lactato sódico.

Los parámetros correspondientes a las curvas de la figura 1, ajustadas según un modelo de tipo hiperbólico, se muestran en la tabla 1. El Al redujo significativamente tanto la captación máxima ( $22,1 \pm 3,4$  vs.  $15,3 \pm 1,9$  nmol Ca/mg prot.,  $P < 0,05$ ) como la constante Km ( $2,1 \pm 0,4$  vs.  $1,4 \pm 0,2$  mM,  $P < 0,05$ ), comparado con el control. El reemplazo del medio que contenía Al por un medio libre de Al no evitó esta disminución.

El efecto inhibitorio del Al sobre la CaUPT fue dependiente de la concentración de Al, mostrando una curva dosis-respuesta, % reducción CaUPT vs.  $\log [Al]$ , sigmoidea tipo *uphill* (figura 2). La concentración de Al que produce la mitad de la inhibición máxima ( $IC_{50}$ ) fue de  $30,1 \pm 2,3 \mu M$  a pH 7,4. El  $IC_{50}$  obtenido a pH 6,5 fue  $19,3 \pm 7,8 \mu M$  ( $P < 0,05$ ). No se encontró variación significativa en el porcentaje máximo de reducción de la CaUPT (inhibición máxima,  $I_{max}$ ) que fue  $\sim 55\%$  para ambos pH del medio.

Los valores de los parámetros  $I_{max}$  y  $IC_{50}$  de la curva dosis-respuesta obtenida con enterocitos aislados de pollos deficientes en vitamina D, a pH 7,4, fueron coincidentes con los obtenidos en enterocitos aislados de animales repletados con vitamina D (dieta normal)

El pretratamiento de las células con ionóforo A23187 produjo un muy significativo aumento tanto de CaUPT como del % inhibición por el Al (figura 3). En las células tratadas con U73122 no se observaron diferencias respecto de las tratadas con vehículo. Capsaicina  $20 \mu M$  produjo un aumento significativo de CaUPT aunque solo un ligero incremento en el % de reducción por el Al.

En presencia tanto de nifedipina como de diltiazem, la CaUPT se redujo significativamente respecto del control y la inhibición del Al resultó completamente anulada (figura 4).

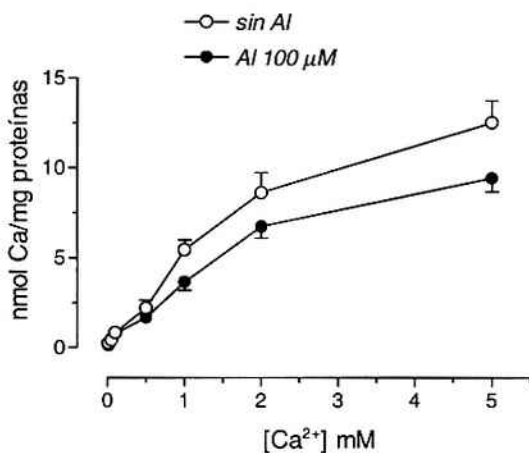
**Tabla 1:** Efecto del aluminio sobre los parámetros de las curvas de captación de  $^{45}Ca$  (CaUPT) en función de la concentración de calcio total del medio, en enterocitos aislados de pollo.

	CaUPTmax (nmol Ca/mg prot.)	Km (mM)
Control sin Al	$22,1 \pm 3,4$	$2,1 \pm 0,4$
Al $100 \mu M$	$15,3 \pm 1,9^*$	$1,4 \pm 0,2^*$
Al $100 \mu M$ + lavado con medio sin Al	$15,1 \pm 2,1^*$	$1,5 \pm 0,3^*$

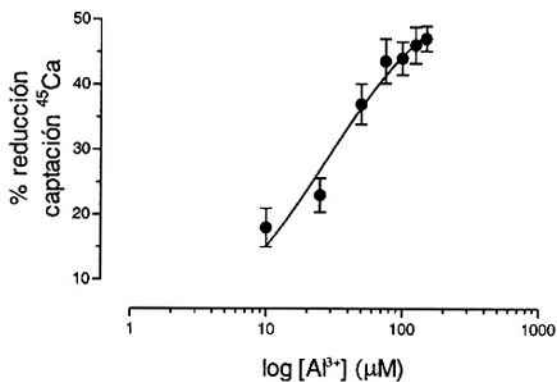
Los datos son valor calculado  $\pm$  D.S (limite de confianza 95%)

\* $P \leq 0,05$  comparado con el grupo control sin Al.

**Figura 1:** Efecto del aluminio sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en enterocitos aislados de pollo. Cada punto es promedio  $\pm$  SEM (n=6).



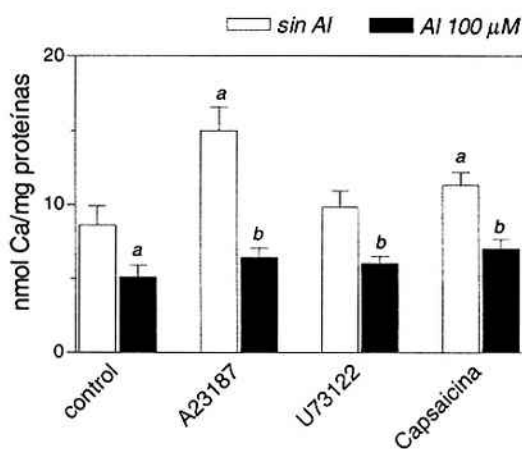
**Figura 2:** Curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  por el aluminio vs. log de la concentración de aluminio, a pH 7,4. Cada punto es promedio  $\pm$  SEM (n=6).



**Figura 3:** Efecto del aluminio sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en enterocitos aislados a pH 7,4, medido en presencia de ionóforos de calcio: A23187 1  $\mu\text{M}$ , U73122 1 nM y capsaicina 20  $\mu\text{M}$ . Datos son promedio  $\pm$  SEM (n=6).

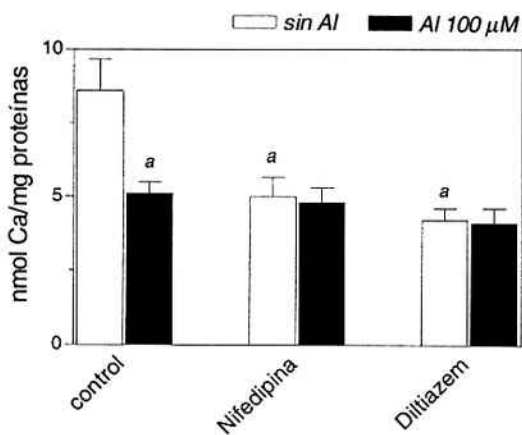
<sup>a</sup> $P \leq 0,05$  vs. vehículo sin aluminio.

<sup>b</sup> $P \leq 0,05$  vs. correspondiente control sin aluminio.



**Figura 4.** Efecto del aluminio sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en enterocitos aislados a pH 7,4, medido en presencia de bloqueadores de canales de Ca tipo L: nifedipina 10  $\mu\text{M}$  y diltiazem 10  $\mu\text{M}$ . Datos son promedio  $\pm$  SEM (n=6).

<sup>a</sup> $P \leq 0,05$  vs. vehículo sin aluminio.



## Discusión y conclusiones

Los resultados muestran que la entrada de Ca en el enterocito de pollo a través de la membrana de la microvellosidad sigue un proceso de saturación que resultó posible de describir con una ecuación del tipo de Michaelis-Menten. La presencia de aluminio en el medio redujo tanto la velocidad máxima de captación ( $CaUPT_{max}$ ) como la constante de afinidad ( $K_m$ ), y este efecto se mantuvo luego de eliminar el Al del medio de incubación. Estos datos podrían significar que el Al es capaz de unirse a los distintos canales-transportadores y competir con el Ca por los sitios activos.

No hay en la bibliografía reportes previos acerca del efecto del Al sobre la entrada de Ca en células epiteliales del intestino. El Al podría afectar la  $CaUPT$  a través de una acción sobre los canales de Ca (en la entrada del canal o dentro de los mismos canales), produciendo cambios en las señales intracelulares de Ca y/o mediante un efecto general sobre la membrana de la microvellosidad. Los cortos períodos de incubación de los enterocitos con el Al en nuestros experimentos, no permiten analizar los eventuales efectos del metal sobre la síntesis y regulación de las proteínas constitutivas de los canales de Ca de la microvellosidad, que por lo tanto, no pueden ser descartados.

Para identificar los sitios de acción del Al se utilizaron drogas que actúan sobre distintos tipos de canales de Ca. Los canales iónicos de Ca pasan por una serie de estados de transición que incluyen: reposo, abierto e inactivo, produciéndose en ellos cambios conformacionales (27), y cada uno de estos estados ofrece una oportunidad de acceso diferente o exhibe una afinidad distinta por una droga o ion (20). Nifedipina y diltiazem interaccionan con tres receptores discretos asociados con los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, produciendo su bloqueo (21). El A23187 es un ionóforo altamente selectivo para el calcio que actúa como un transportador móvil, intercambiando protones por cationes divalentes como Ca o magnesio que entran a las células desde el fluido extracelular siguiendo un marcado gradiente electroquímico (27). U73122 inhibe la hidrólisis del inositol pirofosfato a inositol fosfato lo que lleva a una disminución en el calcio libre citoplasmático y, en consecuencia, a la activación

de los canales de Ca dependientes de las reservas intracelulares. La Capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) estimula un receptor específico (VR1) emparentado estructuralmente con el transportador de calcio similar a un canal ( $CaT1$ ), recientemente descubierto, que media la absorción intestinal del calcio (22).  $CaT1$  comparte una similitud estructural (75% de identidad) con el canal epitelial de Ca ( $EaCa$ ) del riñón de conejo. Muestra también una similitud moderada con el receptor de capsaicina (VR1), el cual es un canal catiónico no selectivo dependiente de ligando y está estructuralmente relacionado con los miembros de la familia de canales TRP (*Transient Receptor Potential*) (26).  $CaT1$  podría representar una transición evolutiva entre un canal y un transportador facilitado.  $CaT1$  es bastante específico para el Ca, mostrando sólo moderada capacidad de transportar estroncio o bario (24).

Los resultados obtenidos con estas sustancias sugieren que el Al podría reducir la entrada de Ca en los enterocitos de pollo actuando sobre canales de Ca dependientes del voltaje, con menos probabilidad sobre canales epiteliales similares a  $CaT1$ , pero no sobre canales de Ca activados por ligando y dependientes de las reservas de Ca.

La inhibición de la captación de radiocalcio por el Al mostró estar relacionada con la concentración del metal en el medio. Si bien la inhibición máxima no varió con el pH, el  $IC_{50}$  de la curva dosis-respuesta del Al medido a pH ácido se redujo significativamente comparada con el obtenido a pH 7,4. Este hallazgo sería relevante *in vivo* ya que el reflujo de jugo gástrico hacia el duodeno reduce el pH del medio luminal en las porciones superiores del intestino delgado, y en estas condiciones el Al tendría un mayor efecto inhibitorio (menor  $IC_{50}$ ) sobre la captación de Ca por el enterocito. El cambio en el patrón de especiación del Al como consecuencia de la disminución del pH, produciría un incremento de la concentración de Al libre que sería responsable de este efecto (19).

Los parámetros de la curva dosis-respuesta del Al en enterocitos provenientes de animales deficientes en vitamina D no mostraron variaciones comparados con las células obtenidas de pollos repletados con vitamina D, sugiriendo que el efecto inhibitorio del Al sobre la entrada de Ca es independiente de la vitamina D. Con respecto a la influencia



de la vitamina D sobre el proceso de entrada del Ca en el enterocito, se halló que el nivel duodenal de ARNm para CaT1 no respondió a la administración de  $D_3$  ni a una dieta deficiente en Ca, *in vivo* (23). Esto está de acuerdo con estudios previos que demostraban que la entrada apical de Ca no es sustancialmente regulada por  $D_3$ . Sin embargo, como la totalidad de la absorción transcelular de Ca es regulada por  $D_3$  (incluyendo la regulación de la síntesis de calbindin  $D_{9k}$ ) sería de esperar que la actividad de CaT1 fuera regulada directa o indirectamente por el nivel en el organismo de  $D_3$  o Ca para prevenir una acumulación intracelular tóxica de Ca (25).

Estas acciones del Al sobre la entrada de calcio cobrarían importancia para explicar la toxicidad del metal tanto en células no-excitables que transportan Ca (enterocitos), como en células excitables (nerviosas) que son blanco del Al y que poseen un complejo sistema de manejo de señales de Ca a través de diferentes tipos de canales iónicos, en donde un desequilibrio en la homeostasis intracelular del Ca podría conducir a estados que ocasionarían tanto disfunciones como muerte neuronal.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó con fondos del proyecto C.A.I+D 2000: 20-T.I 13-programa 1, Universidad Nacional del Litoral.

## Bibliografía

- Yokel, R. 2004. Aluminum. In *Elements and their compounds in the environment, Occurrence, analysis and biological relevance* (E. Merian, M. Anke, M. Ihnat, and M. Stoepler, Eds.), 2nd Edition, Volume 2, pp 635-658, by Wiley-VCH.
- Goyer, R.A. 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu.Rev.Nutr.* **17**, 37-50.
- 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.
- Adler A.J and Berlyne G.M. 1985. Duodenal aluminum absorption in the rat: effect of vitamin D. *Am. J.Physiol.* **249**, G209-G213.
- Cox, K.A. and Dunn, M.A. 2001. Aluminum toxicity alters the regulation of calbindin-D28k protein and mRNA expression in chick intestine. *J.Nutr.* **131**, 2007-2013.
- 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
- Bronner, F. 1998. Calcium absorption - A paradigm for mineral absorption. *J.Nutr.* **128**, 917-920
- Fullmer, C.S., Chandra, S., Smith, C.A., Morrison, G.H. and Wasserman, R.H. 1996. Ion microscopic imaging of calcium during 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated intestinal absorption. *Histochem. Cell. Biol.* **106**, 215-222
- Wood, R.J., Tchack, L. and Taparia, S. 2001. 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line. *BMC Physiology* **1**, 11-18.
- Barley, N.F., Howard, A., O'Callaghan, D., Legon, S., Walters, J.R. 2001. Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am J Physiol* **280**, G285-G290.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lee, E.A., Weiss, S.L., Lam, M., Torres, R., Diamond, J. 1998. A method for assaying intestinal brush-border sucrose in an intact intestinal preparation. *PNAS* **95**, 2111-2116.
- 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.
- 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.
- Schwartz LM, Osborne BA (eds.). 1995. Cell Death. Methods in cell biology. Academic Press, Londres, UK.
- Walter, K., Schutt, C. 1974. Acid and alkaline phosphatase in serum Two-point method. In: Bergmeyer, H.U. (ed.) , Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York, pp. 856-860.
- 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.
- Busselberg, D. 1995. Calcium channels as target sites of heavy metals. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 255-261.



21. Triggie, D.J. 1999. The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Review. *European J. Pharmacol.* **375**, 311–325.
22. Peng, J.B., Chen, X.Z., 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.
23. Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Hartog, A., van de Graaf, S.F., van Os, C.H., Willems, P.H., Bindels, R.J. 1999. Molecular identification of the apical  $\text{Ca}^{2+}$  channel in 1,25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J Biol Chem* **274**, 8375–8378.
24. Hoenderop, J.G., Willems, P.H., Bindels, R.J. 2000. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am. J. Physiol.* **278**, F352–F360.
25. Niemeyer, B.A., Bergs, C., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Trost, C. 2001. Competitive regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -like-mediated Ca entry by protein kinase C and Calmodulin. *PNAS* **98**(6), 3600–3605.
26. Birnbaumer, L., X. Zhu, M. Jiang, G. Boulay, M. Peyton, Vannier, D. Brown, D. Platano, H. Sadeghi, E. Stefani, and M. Birnbaumer. 1996. On the molecular basis and regulation cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *PNAS* **93**, 15195–15202.
27. Barritt, G.J. 1999. Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling requirements. Review. *Biochem. J.* **337**, 153–169.