

## Interacción calcio-fosfatasa alcalina intestinal de rata in vitro e in vivo

La fosfatasa alcalina intestinal (FAi) es una enzima del borde en cepillo del enterocito. En estudios in vitro con FAi purificada se demostró fijación de calcio a la enzima con modificaciones funcionales y estructurales. Su presenta un efecto bifásico en función de la concentración de calcio, con incrementos de la misma a concentraciones menos a 10 mM e inhibición no competitiva cuando la concentración es mayor a 20 mM.

La reversibilidad del efecto de calcio y el proceso de agregación es desconocida. El punto isoeléctrico de la enzima era más alto en la presencia de calcio, pero era el mismo para la enzima y la forma agregada. El tratamiento con EGTA después de la adición de calcio no restauró la actividad enzimática, pero produjo desagregación de la enzima y el aumento de las subunidades de FAi, por lo que se estima que el calcio podría ser requerido para la acción de la enzima o estar involucrado en la estabilidad de la estructura del dímero.

Empleando el modelo de intestino aislado in situ y determinación histoquímica se determinó el efecto de las diferentes concentraciones de Ca in vivo sobre la actividad de la FAi. No se observó el efecto bifásico hallado in vitro, sino que el Ca produjo estimulación a medida que la concentración del catión fue mayor. Debido que en el modelo de intestino aislado el proceso de absorción se encuentra en funcionamiento y por ende las concentraciones de Ca se modifican a lo largo del experimento se debió confirmar este hallazgo. Para ello se emplearon duodenales sin exposición al Ca, los cuales fueron incubados con EGTA para quelar el posible Ca presente proveniente de la dieta y se realizó la determinación histoquímica de la actividad de FAi empleando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato como sustrato en presencia de diferentes concentraciones de Ca. Los resultados obtenidos de este experimento mostraron el mismo patrón que los experimentos de intestino aislado, lo cual confirma que el efecto del Ca sobre la FAi es diferente según la localización de la enzima: purificada o libre, o anclada a membrana.

Estos datos sumado a que la FAi modifica su expresión de acuerdo a los niveles de vitamina D hacen sospechar que podría actuar en el mecanismo de absorción del calcio (Ca). La IAP 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.

Se realizaron experimentos de sacos duodenales evertidos a fin de determinar el pH y la absorción de Ca en función de diferentes concentraciones de Ca luminal (1, 10, 50 y 100 mM).

Se observó un aumento significativo de la actividad de la enzima en la membrana a partir de 10 mM Ca<sup>2+</sup>. (IOD = 0mM: 0.38±0.09; 1 mM: 0.38±0.11; 10 mM: 0.52±0.12; 50mM: 0.48±0.15; 100 mM: 0.50±0.09). Los resultados de expresión de IAP 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. Se observó un descenso significativo del pH en soluciónM de los grupos con 10, 50 y 100 mM (pH= 1 mM: 7.33±0.05; 10 mM: 7.10±0.03; 50mM: 6.64±0.09; 100 mM: 6.59±0.06). La fracción de absorción disminuyó a medida que se incrementó la concentración de Ca<sup>2+</sup> (porcentaje de absorción = 1 mM: 81.67±5.15; 10 mM: 48.66±4.11; 50mM: 26.96±4.27; 100 mM: 19.08±9.27). Se concluye que la fracción de absorción de Ca<sup>2+</sup> disminuye paralelamente al descenso de pH. Estos resultados fortalecerían la hipótesis que el pH regularía la entrada de Ca<sup>2+</sup> por vía transcelular y la IAP sería sensora de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> luminal e impediría el ingreso de cantidades tóxicas del catión al enterocito.