

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**MECANISMOS MOLECULARES DESENCADENADOS POR  
EL DEOXICOLATO DE SODIO EN INTESTINO.  
IMPLICANCIAS EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE  
CALCIO.**

Trabajo de Tesis para optar al Título de  
Doctor en Ciencias de la Salud

**María Angélica Rivoira**

**CÓRDOBA**  
**REPÚBLICA ARGENTINA**  
**2012**

## **COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS**

Directora: **Dra. Nori Tolosa de Talamoni**

Integrantes: **Dra. Beatriz Alicia García**

**Dr. Juan Carlos Vergottini**

**Artículo 28 del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la  
Salud.**

**“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS  
OPINIONES DE ESTA TESIS”**

## DEDICATORIAS

*A mis padres*

*A mi esposo*

*A mis hijos*

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi sincero agradecimiento a quienes durante todos estos años me acompañaron, colaboraron y brindaron su apoyo para que yo pudiera culminar con mi proyecto de Tesis.*

*Quiero expresar, en primer lugar, mi profundo agradecimiento a la Dra. Nori Tolosa de Talamoni por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza, su dedicación constante en la dirección de la Tesis, pero principalmente por brindarme su experiencia, apoyo incondicional y motivación permanente.*

*A los miembros de la Comisión de Seguimiento, Dra. Beatriz Alicia García y Dr. Juan Carlos Vergottini, por sus valiosos aportes, por brindarme su tiempo y apoyo.*

*Mi cariño y gratitud a todas mis compañeras de laboratorio con quienes compartí cálidos momentos: Valeria, Adriana, Gaby Picotto, Luciana, Cecilia, Veka, Ágata, y un especial reconocimiento a Ana María, Elena, Gaby Díaz y Viviana por su generosa y valiosa colaboración en la realización del trabajo de laboratorio pero principalmente por brindarme su afecto.*

*A todo el personal de la Cátedra, por su cariño.*

*A mis compañeros del Laboratorio Clínico por su apoyo permanente, un reconocimiento especial a Sandra, por su colaboración constante.*

*A mis padres, por brindarme todos los días tanto cariño, colaboración, estímulo permanente y por ser mi ejemplo de vida.*

*Finalmente un agradecimiento muy especial a mi esposo José por su generosidad, su paciencia, su apoyo permanente y sobre todo por brindarme siempre tanto amor, y a mis hijos, Paula, Cande, Pilar y Juan por regalarme todos los días alegría, frescura y amor.*

# ÍNDICE

Capítulo 1: <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
Capítulo 2: <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
Capítulo 3: <b>RESULTADOS</b> .....	38
Capítulo 4: <b>DISCUSIÓN</b> .....	57
Capítulo 5: <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolismo  
Fosfocálcico y Vitamina D “Dr. Fernando Cañas” de la  
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de  
Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. INICSA  
(CONICET - UNC).

**Con los resultados de esta Tesis se realizó la siguiente publicación:**

**“Sodium deoxycholate inhibits chick duodenal calcium absorption through oxidative stress and apoptosis”.** María A. Rivoira, Ana M. Marchionatti, Viviana A. Centeno, Gabriela E. Díaz de Barboza, María E. Peralta López, Nori G. Tolosa de Talamoni. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.** 162: 397-405. **2012.**

Resultados parciales de esta tesis fueron presentados en diversas reuniones científicas nacionales e internacionales: SEMCO, Córdoba, Argentina (2007), 35 th European Symposium on Calcified Tissues (2008) Barcelona, España, SIBOMM (2009) Foz do Iguazú, Brasil, AAOMM (2010), Córdoba, Argentina.

Distinciones recibidas con el presente trabajo:

PREMIO “SEMCO” AL MEJOR TRABAJO ÁREA BÁSICA en la VIII Jornadas Científicas de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba (SEMCO). Noviembre de 2007. Córdoba. Argentina.

Seleccionado entre los mejores trabajos para participar por el PREMIO a la INVESTIGACIÓN BÁSICA en la XXVII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral AAOMM. Septiembre 2010. Córdoba. Argentina.

El trabajo de Tesis se realizó con los aportes recibidos de CONICET (2010-2012), FONCYT (PICT 2005-32464) y SECyT (UNC).

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Efecto del DXCS sobre la actividad de las enzimas del sistema antioxidante en mucosa duodenal.....**52**

**Tabla 2.** Efecto del DXCS sobre el índice apoptótico en enterocitos duodenales y células del tejido conectivo.....**55**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntesis de los ácidos biliares.....	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los posibles mecanismos involucrados en la absorción intestinal de $\text{Ca}^{+2}$ .....	<b>20</b>
<b>Figura 3.</b> Efecto de deoxicolato de sodio (DXCS) 20 mM sobre la absorción intestinal de $\text{Ca}^{+2}$ a diferentes tiempos.....	<b>41</b>
<b>Figura 4.</b> Efecto de la concentración de DXCS sobre la absorción intestinal de $\text{Ca}^{+2}$ al cabo de 30 min. de tratamiento.....	<b>41</b>
<b>Figura 5.</b> Morfología del tejido intestinal en animales controles y tratados con DXCS 10 mM a 60 min.....	<b>42</b>
<b>Figura 6.</b> Efecto del DXCS 10 mM sobre la actividad de FAI en sobrenadante mucosa duodenal.....	<b>43</b>
<b>Figura 7.</b> Efecto de DXCS 10 mM sobre la expresión del ARNm de <i>ncx1</i> y <i>cb</i> en mucosa de duodeno de pollo.....	<b>44</b>
<b>Figura 8.</b> Efecto de DXCS 10 mM sobre la expresión del ARNm de <i>pmca<sub>1b</sub></i> en mucosa de duodeno de pollo.....	<b>45</b>
<b>Figura 9.</b> Efecto de DXCS 10 mM sobre la expresión proteica de $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ y calbindina $\text{D}_{28\text{k}}$ .....	<b>47</b>

<b>Figura 10.</b> Efecto del DXCS 10 mM sobre la inmunolocalización de calbindina D <sub>28k</sub> en células del ápice de la vellosidad duodenal después de 30 min de tratamiento.....	<b>48</b>
<b>Figura 11.</b> Efecto del DXCS 10 mM sobre la generación de radicales libres hidroxilos en enterocitos maduros aislados de la vellosidad duodenal.....	<b>49</b>
<b>Figura 12.</b> Efecto de distintas concentraciones de DXCS sobre la densidad óptica ( <i>swelling</i> ) de mitocondrias aisladas de enterocitos de pollo.....	<b>50</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto del DXCS 10 mM sobre el contenido de GSH total en sobrenadante de mucosa duodenal.....	<b>51</b>
<b>Figura 14.</b> Expresión de citocromo c en fracción mitocondrial y citosólica de homogeneizado de enterocitos después del tratamiento con DXCS 10 mM (Western blot).....	<b>53</b>
<b>Figura 15.</b> Fragmentación de ADN por técnica de TUNEL en vellosidades duodenales de pollo.....	<b>54</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto de DXCS 10 mM, quercetina 50µM y el tratamiento combinado sobre la absorción intestinal de calcio.....	<b>56</b>
<b>Figura 17.</b> Mecanismo hipotético del DXCS sobre la absorción intestinal de calcio y variables asociadas.....	<b>68</b>

## ABREVIATURAS

**15-PGDH:** 15- hidroxiprostaglandina deshidrogenasa.

**AB:** ácidos biliares

**Apaf1:** factor de activación de proteasa apoptótica 1.

**ASBT:** transportador de ácidos biliares dependiente de sodio.

**BSO:** DL-butionina-S,R-sulfoximina.

**CA:** ácido cólico.

**Ca<sup>+2</sup>:** calcio iónico.

**CAT:** catalasa.

**CB:** calbindina D.

**CB<sub>28k</sub>:** calbindina D<sub>28k</sub>.

**CB<sub>9k</sub>:** calbindina D<sub>9k</sub>.

**CBP:** cirrosis biliar primaria.

**CDCA:** ácido quenodeoxicólico.

**COX-2:** ciclooxigenasa – 2.

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina.

**DMO:** densidad mineral ósea.

**DMPO:** 5,5-dimetil 1-pirrolina.

**DXC:** ácido deoxicólico.

**DXCS:** deoxicolato de sodio.

**ESR:** espectro de resonancia electrónica de *spin*.

**FAI:** fosfatasa alcalina intestinal.

**FXR:** receptor farnesoide X.

**GPx:** glutatión peroxidasa.

**GSH:** glutatión.

**GSSG:** glutatión oxidado.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno.

**LCA:** ácido litocólico.

**LEC:** líquido extracelular.

**LRH-1:** receptor hepático homólogo -1.

**MBL:** membrana basolateral.

**MEN:** 2-metil-1,4-naftoquinona.

**NCX1:** intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ .

**NFkB:** factor nuclear kappa B.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** anión superóxido.

**PBS:** *buffer* fosfato salino.

**PGE2:** prostaglandina E2.

**PLA2:** fosfolipasa A2.

**PMCA<sub>1b</sub>:**  $\text{Ca}^{+2}/\text{ATPasa}$ .

**QT:** quercetina.

**RIPA:** *buffer* de lisis.

**ROS:** especies reactivas de oxígeno.

**RVD:** receptor de vitamina D.

**SOD:** superóxido dismutasa.

**TGR5:** receptor de membrana acoplado a proteína G.

**TRP:** receptor de potencial transiente.

**UDCA:** ácido ursodeoxicólico.



# **RESUMEN**

Altas concentraciones de deoxicolato de sodio (DXCS) producen efectos tóxicos en el intestino. Este estudio explora el efecto de concentraciones fisiológicas altas de DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  y los mecanismos moleculares involucrados. Para ello, se usaron pollos de 4 semanas de edad, los cuales se dividieron en dos grupos: controles y tratados con DXCS en la luz intestinal, a diferentes tiempos y concentraciones. La absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió por la técnica del asa intestinal ligada *in situ*. Se estudió la expresión de genes y de proteínas involucradas en la vía transcelular de la absorción del catión. El contenido de glutatión (GSH) y la actividad de enzimas del sistema antioxidante se evaluaron por espectrofotometría. La producción de ROS se determinó por espectrometría de resonancia de espín y los cambios en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial mediante la técnica de *swelling*. La apoptosis se estudió a través de la localización subcelular de citocromo c por Western blot y la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL. DXCS inhibió la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$ , efecto que fue dependiente de la concentración de la sal biliar. La expresión del ARNm de la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa disminuyó por el tratamiento con la sal biliar y lo mismo ocurrió con la expresión de las proteínas involucradas en el proceso de absorción del catión:  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  y calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$ . DXCS produjo estrés oxidativo, a juzgar por la generación de ROS, la depleción de glutatión y el *swelling* mitocondrial. Además, la presencia del antioxidante quercetina en el medio de incubación

bloqueó el efecto inhibitorio del DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$ . El DXCS desencadenó también apoptosis, como lo indica la tinción positiva de TUNEL y la liberación del citocromo c desde la mitocondria. Como mecanismo compensatorio, las enzimas del sistema antioxidante aumentaron sus actividades aunque sin poder normalizar el estado redox. En conclusión, una dosis fisiológica alta de DXCS inhibe la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la disminución de las proteínas que participan en la vía transcelular de la absorción intestinal del catión, como consecuencia del estrés oxidativo y la apoptosis mediada por la mitocondria.



# **SUMMARY**

High concentrations of sodium deoxycholate (NaDOC) produce toxic effects. This study explores the effect of a single high concentration of NaDOC on the intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption and the underlying mechanisms. Chicks were divided into two groups: 1) controls, 2) treated with different concentrations of NaDOC in the duodenal loop for variable times. Intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption was measured as well as the gene and protein expression of molecules involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  transcellular pathway. Glutathione (GSH) content and the activity of antioxidant enzymes were assessed by spectrophotometry. ROS was determined by spin resonance spectrometry and permeability changes of the internal mitochondrial membrane by the swelling technique. Apoptosis was studied by cytochrome c localization through Western blot and DNA fragmentation (TUNEL procedure). NaDOC inhibited the intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption, which was dose dependent.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mRNA decreased by the bile salt and the same occurred with the protein expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, calbindin  $\text{D}_{28\text{k}}$  and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. NaDOC produced oxidative stress as judged by ROS generation, mitochondrial swelling and glutathione depletion. Furthermore, the antioxidant quercetin blocked the inhibitory effect of NaDOC on the intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption. Apoptosis was also triggered by the bile salt, as indicated by the TUNEL staining and the cytochrome c release from the mitochondria. As a compensatory mechanism, enzyme activities of the antioxidant system were all increased, but the cellular redox state was not normalized. In conclusion, a single high dose of NaDOC inhibits intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption through downregulation of proteins involved in the transcellular pathway, as a consequence of oxidative stress and mitochondria mediated apoptosis.

Capítulo 1

# **INTRODUCCIÓN**

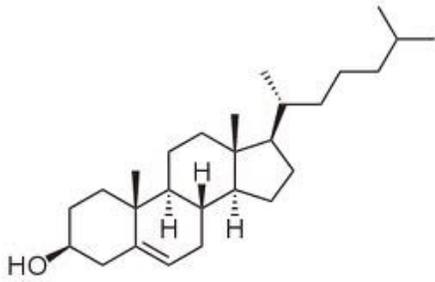
La bilis es producida en el hígado en forma continua y se acumula en la vesícula biliar en los períodos interdigestivos. Es una secreción esencial para la digestión y la absorción intestinal de lípidos y vitaminas liposolubles provenientes de la dieta, además es una importante vía de eliminación de toxinas, carcinógenos, drogas y sus metabolitos (xenobióticos). La bilis es también la principal vía de excreción de productos metabólicos (endobióticos) tales como colesterol, bilirrubina y hormonas (86). La bilis es un líquido complejo; difiere de otras secreciones por su alto contenido relativo de lípidos insolubles en agua (fosfatidilcolina y colesterol) y otros compuestos, los ácidos biliares (AB). Contiene además pigmentos biliares, urea, proteínas, principalmente mucoproteínas, y electrolitos inorgánicos en concentraciones similares a las del plasma sanguíneo. Los AB son los principales componentes orgánicos de la bilis, la cual está constituida por el 67% de AB, el 22% de fosfolípidos, el 5% de colesterol, el 5% de proteínas y el 1% de pigmentos biliares (42).

Los AB son compuestos relacionados con el ciclopentanoperhidrofenantreno. Los AB primarios, cólico (CA) y quenodeoxicólico (CDCA), son sintetizados en el hígado a partir del colesterol a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas localizadas en el citosol, microsomas, mitocondrias y peroxisomas de los hepatocitos constituyendo la principal vía metabólica del catabolismo del colesterol en humanos (85). Después de su síntesis los AB son conjugados en el grupo carboxilo terminal con glicina (75%) o taurina (25%) y posteriormente excretados hacia la vesícula biliar en una concentración de aproximadamente 100 mM (94). Cuando el contenido gástrico llega al intestino, los AB son vertidos hacia el

duodeno. Durante su tránsito por el intestino, ellos sufren modificaciones por acción de las bacterias de la flora intestinal, la primera modificación es la desconjugación produciéndose AB libres pobremente ionizados y lipofílicos y la segunda reacción es la  $7\alpha$  deshidroxilación (biotransformación cuantitativamente más importante), para dar origen a los AB secundarios deoxicólico (DXC) y litocólico (LCA) a partir de los AB primarios, CA y CDCA, respectivamente (Fig. 1). En el colon se forma el ácido ursodeoxicólico (UDCA), AB terciario, también por degradación bacteriana. El DXC o su sal sódica el deoxicolato de sodio (DXCS) es el principal y más abundante AB secundario producido en humanos.

Los AB son compuestos anfipáticos. Los grupos hidroxilos están ubicados del mismo lado de la molécula (todos en posición  $\alpha$  en los AB más comunes) y junto con los grupos ionizados ( $\text{COO}^-$  y  $\text{SO}_3^-$ ) interaccionan con agua. La otra cara del núcleo esteroideo es marcadamente hidrofóbica. El grado de hidrofobicidad es determinante de la toxicidad de los AB, esta propiedad depende no solo del número, posición y orientación de los grupos hidroxilos, sino también de la conjugación en el  $\text{C}_{24}$ . El orden de magnitud de hidrofobicidad de los AB es  $\text{LCA} > \text{DXC} > \text{CDCA} > \text{CA} > \text{UDCA}$ . El ácido biliar hidrofóbico DXC está asociado a carcinogénesis (90), en contraste el ácido hidrofílico UDCA, posee propiedades citoprotectoras y es la primera elección en el tratamiento de los síndromes colestásicos severos (5).

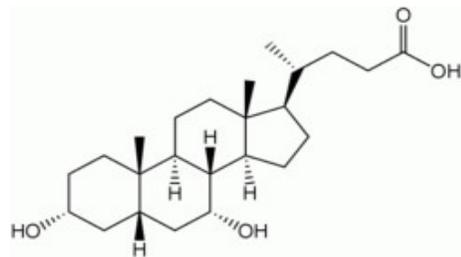
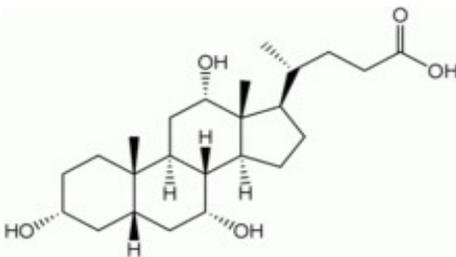
## **colesterol**



ácido

### ácidos biliares primarios

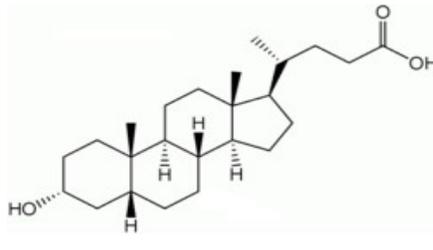
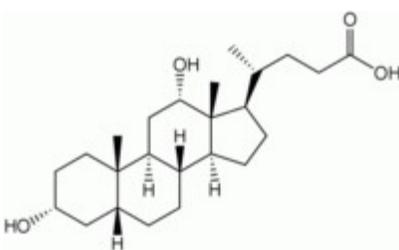
ácido cólico



### ácidos biliares secundarios

ácido litocólico

ácido



**Figura 1.** Síntesis de los ácidos biliares. Los AB primarios, cólico (CA) y quenodeoxicólico (CDCA), son sintetizados en el hígado a partir del colesterol. Durante su tránsito por el intestino, ellos sufren modificaciones por acción de las bacterias de la flora intestinal. La 7 $\alpha$  deshidroxilación

(biotransformación cuantitativamente más importante) da origen a los AB secundarios deoxicólico (DXC) y litocólico (LCA) a partir de los AB primarios.

Una vez finalizada la tarea digestiva, los AB son eficientemente reabsorbidos en el intestino (95%), principalmente en el íleon por transporte activo a través del transportador de AB dependiente de sodio (ASBT), ubicado en la membrana en borde en cepillo. Los AB son transportados al hígado por vena porta para ser conjugados y secretados nuevamente en la bilis (circulación enterohepática). Llegan al colon menos del 5% del *pool* de los AB (70). Cada uno de los AB completa 4 a 12 ciclos entre el hígado y el intestino por día (35), sólo una pequeña cantidad del *pool* de AB deriva de la biosíntesis *de novo* debido a la eficiente circulación enterohepática (61).

En la última década, con el descubrimiento de un receptor nuclear específico de los AB, el receptor farnesoide X (FXR) (76) y más recientemente un receptor de membrana acoplado a proteína G (TGR5) (107), adquirió importancia el rol de los AB como moléculas de señales ejerciendo destacadas funciones parácrinas y endócrinas. Además de la regulación de su propia síntesis y del transporte intestinal y hepático, los AB inducen repuestas adaptativas a la colestasis y a otras injurias del hígado. También es importante la participación de los AB en el metabolismo energético y, más precisamente, en el manejo de la glucemia (75).

Los AB, por su carácter anfipático, se comportan como detergentes siendo esta propiedad, en muchos casos, la principal causa del daño inducido por ellos cuando se acumulan en el hígado u otros órganos (85).

El DXCS se encuentra en alta proporción en el colon de humanos que ingieren una dieta con alto contenido en grasas (96). El aumento probablemente refleja una mayor deposición de estos AB al tracto gastrointestinal para emulsionar el aumento de las grasas de la dieta. Altos niveles de AB hidrofóbicos en humanos están asociados con mayor incidencia de cáncer en distintos segmentos del tracto gastrointestinal como esófago, estómago, páncreas, intestino delgado y colon (13). Además, se ha demostrado que el DXCS está aumentado en el agua fecal de pacientes con cáncer colorrectal (56). Cuando las células de colon (normales y tumorales) son expuestas a concentraciones fisiológicas altas de DXCS, se produce la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y daño en el ADN, en el cual se encuentran bases pirimidínicas oxidadas (101); la deficiencia en los sistemas de reparación del ADN está asociada a mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon en humanos (12).

La colestasis es una característica común de varias enfermedades hepáticas crónicas en humanos, en la cual se produce retención y acumulación de AB hidrofóbicos, como el DXCS, siendo la principal causa del daño producido en los hepatocitos (10). Varios mecanismos son los responsables de la injuria producida por la sal biliar en el hígado colestásico, como la alteración de las membranas celulares por la acción detergente (16) y la promoción de la generación de ROS, que pueden modificar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y, eventualmente,

causar apoptosis (105). En tejido hepático de ratas machos Sprague-Dawley, expuestas a los AB, se produce también aumento en la oxidación de lípidos y proteínas, efecto que es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición a los AB (47).

La citotoxicidad del DXCS es atribuida al estrés oxidativo celular que provoca, el cual altera la función mitocondrial, el retículo endoplásmico y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que pueden llevar a la apoptosis (91). Un mecanismo por el cual el DXCS puede inducir estrés oxidativo en las células es la generación de ROS ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ) durante el transporte de electrones mitocondrial (118). Krähenbühl y col. (69) demostraron que los AB inhiben el complejo III de la cadena respiratoria en mitocondrias aisladas de hígado de rata, lo que puede producir depleción en los niveles de ATP.

El esófago de Barrett es una condición clínica pre-maligna asociada a enfermedad de reflujo gastro-esofágico, en la cual se produce un cambio anormal de las células epiteliales escamosas de la porción terminal del esófago por epitelio cilíndrico columnar, similar al intestinal, que contiene células caliciformes (células de goblet). Es decir, se produce una metaplasia, como consecuencia de la exposición crónica al bajo pH y a los AB, producto del reflujo gástrico crónico. Se considera un trastorno pre-maligno, por estar asociado a un mayor riesgo de cáncer del esófago (51). Se ha demostrado que el DXCS está involucrado en la carcinogénesis del adenocarcinoma de Barrett, *vía* inhibición de enzimas que reparan el ADN, inducción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y aumento de la expresión del factor de transcripción CDX-2, efectos mediados por el factor nuclear kappa B

(NFκB). COX-2, es una isoforma inducible de enzimas que participan en la síntesis de prostaglandinas involucradas en la carcinogénesis a través de múltiples mecanismos (apoptosis, angiogénesis, proliferación celular y mutagénesis). CDX-2 es un factor de transcripción importante para el desarrollo del sistema gastrointestinal como para la diferenciación de las *stem cell* gastrointestinales (25).

El DXCS a través de varios mecanismos produce efectos perjudiciales sobre el tracto gastrointestinal. Se ha demostrado, en células de adenocarcinoma de esófago (JH-esoAd1) y en células derivadas de pacientes con enfermedad de Barrett no displásicas, que el DXCS altera las membranas de los lisosomas provocando la acidificación transitoria del citoplasma por liberación del contenido ácido. Esto induce la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , presente en las membranas celulares, produciendo aumento del  $\text{Na}^+$  intracelular. Consecuentemente el  $\text{K}^+$  sale de la célula para mantener la osmolaridad y se produce una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Por lo tanto la exposición al DXCS produce alteración en el balance iónico intracelular (aumento de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y disminución de  $\text{K}^+$ ) que lleva a la activación de caspasas y apoptosis (51).

En muchas células, especialmente las epiteliales, se forman invaginaciones en zonas o microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos. Son las denominadas *cavéolas*, cuya organización y estructura dependen de una proteína dimérica llamada *caveolina*. El DXCS perturba la estructura de las membranas celulares mediante alteración de los microdominios de las membranas. Afecta la distribución de *caveolina* y produce disminución de la fluidez de la membrana por aumento del contenido de colesterol. Induce también

fosforilación de tirosina y activa receptores tirosina quinasa como el receptor del factor de crecimiento epidérmico, de una manera independiente del ligando. Estos datos demuestran que las señales inducidas por el DXCS son iniciadas por las alteraciones provocadas en la estructura de la membrana plasmática y la redistribución del colesterol (63).

Los efectos pro-carcinógenos del DXCS en el colon involucran la estimulación de la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) (PGE2 estimula la proliferación celular, promueve la angiogénesis, induce la invasión celular). Miyaki y col. (84) han demostrado recientemente que el DXCS y el CDCA producen también inhibición de la transcripción de la 15- hidroxiprostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH), enzima clave en el catabolismo de PGE2 en células de colon, lo cual resultaría en un aumento de los niveles de PGE2 que favorece la formación y progresión del cáncer gastrointestinal.

El epitelio intestinal forma una barrera entre el lumen y la submucosa, la cual se mantiene por un conjunto de proteínas que forman parte de las uniones estrechas (*tight junctions*). La barrera epitelial es muy importante para mantener la homeostasis biológica normal. Los AB, principalmente el DXCS, disminuyen la resistencia eléctrica transepitelial en la línea celular Caco-2 a través de la generación de ROS y otros mecanismos de señales, lo cual indica que las *tight junctions* constituyen otro blanco de acción de los AB sobre el tejido intestinal (8).

En células normales de colon, bajas dosis de DXCS inducen proliferación celular por aumento de la expresión de ciclina A, mientras que altas dosis

producen disminución de la expresión de ciclina E (la cual es necesaria para ingresar a la fase S desde la fase G1) y de quinasas dependientes de ciclinas (Cdk2) produciendo supresión de la proliferación celular (55).

En células de adenocarcinoma humano de colon, el DXCS desencadena procesos de apoptosis como resultado de estrés oxidativo con aumento en la producción de ROS, principalmente por activación de NAD(P)H oxidasa y en menor grado de la fosfolipasa A2(PLA2). El DXCS produce modificación del potencial de membrana mitocondrial y liberación de factores proapoptóticos hacia el citosol el cual se confirma por activación de caspasa 9 y 3 pero no de caspasa 8. Esto promueve el clivaje de Bcl-2 con posterior activación de Bax y formación de poros adicionales en la membrana mitocondrial que conducen a amplificar la señal apoptótica (62).

En mucosa de yeyuno se ha demostrado que el DXCS y otras sales biliares no conjugadas producen ruptura de la integridad de las uniones intercelulares conduciendo a la exfoliación del epitelio (88).

El DXCS inhibe las propiedades de transporte intestinal tales como la absorción de agua y el transporte de glucosa asociada al sodio por inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (53), y cambia la absorción por la secreción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en el colon distal (83).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es el quinto elemento en orden de abundancia en el organismo. Es el principal catión divalente en el líquido extracelular (LEC). Se estima que el  $\text{Ca}^{2+}$  corresponde al 1 - 2 % del peso total del cuerpo del hombre adulto normal. Constituye el principal componente de los tejidos mineralizados, los huesos y los dientes, los cuales contienen el 99 % del calcio total del cuerpo. Sus sales

constituyen la porción mineral responsable de las características estructurales y funcionales del hueso. El 1 % restante del catión está distribuido en los líquidos intravascular, fluidos extracelulares, músculo y otros tejidos. El  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para el crecimiento y desarrollo del esqueleto normal y además es importante para mantener la salud de los huesos durante toda la vida (27). El  $\text{Ca}^{2+}$  también participa y regula importantes funciones celulares como contracción y vasodilatación vascular, contracción muscular, transmisión nerviosa y secreción glandular (46), además interviene en otros procesos biológicos como en el ciclo celular y en la muerte celular programada (34, 14).

El nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el plasma sanguíneo es de 10 mg/dL y constituye una constante celosamente mantenida. Existe un sistema de homeostasis notablemente eficiente que mantiene los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulares en valores normales y que es regulado por la acción hormonal. Las principales hormonas calciotrópicas son la hormona paratiroidea, el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y la calcitonina. Éstas tienen efecto sobre células especializadas localizadas en órganos efectores como riñón, hueso e intestino, y son las encargadas del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se modifican los niveles del mismo restaurándose así la concentración del catión a valores normales (38).

El tejido óseo representa un importante reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , que lo almacena o libera al LEC según las necesidades. En este sentido la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la dieta es un proceso esencial para mantener los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , el crecimiento y desarrollo normal del esqueleto, como también para lograr el pico óptimo de masa ósea y modificar la relación de pérdida de masa ósea asociada al envejecimiento (45, 28).

En condiciones fisiológicas, el  $\text{Ca}^{2+}$  iónico es absorbido principalmente en el intestino delgado, el cual es responsable de aproximadamente el 90% de la absorción del  $\text{Ca}^{2+}$  total (122). Cada segmento del intestino delgado contribuye de diferente manera en el proceso de absorción del catión. La mayor parte de la absorción del  $\text{Ca}^{2+}$  ingerido se produce en el segmento inferior del intestino delgado, el íleon. Esto fue estudiado por Marcus y Lengemann (81) quienes demostraron que en el intestino delgado de rata, el 88% de la absorción del calcio se produce en el íleon, el 4% en el yeyuno, y el 8% en el duodeno. Usando estroncio radiactivo como trazador de calcio, Cramer y Copp (36) encontraron que el 65, 17, y 7% de la absorción de calcio en el intestino de la rata se produce en el íleon, yeyuno y el duodeno, respectivamente. Un factor importante que determina la contribución del íleon en la absorción de calcio es, en general, el tiempo de tránsito relativamente largo del calcio en ese segmento con relación a los otros segmentos del intestino delgado. El tiempo del tránsito del  $\text{Ca}^{2+}$  en el íleon de la rata es de 100 – 120 min, mientras que en el duodeno es de 2 - 6 min (81). En el colon y en el estómago se absorbe < del 10% del  $\text{Ca}^{2+}$  total (121).

Los principales determinantes de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  absorbido en su paso por el intestino delgado, son el tiempo de recorrido del catión y la relación de absorción en cada segmento. La velocidad de absorción del catión es mayor en duodeno (120).

El calcio absorbido de la dieta es función de la cantidad de calcio consumido y de la eficiencia del proceso de absorción, el cual se encuentra fuertemente regulado por el estado fisiológico del organismo (crecimiento, embarazo, lactancia, y envejecimiento) y por el contenido de calcio en la dieta. En general cuando las

necesidades aumentan o la ingesta disminuye la eficiencia de absorción del calcio mejora (44).

La absorción intestinal del  $\text{Ca}^{2+}$  se produce por dos vías, una paracelular, pasiva y no saturable y otra transcelular activa.

La vía paracelular de absorción del  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza a través de las uniones entre los enterocitos y la absorción depende de la solubilidad del mineral y la permeabilidad paracelular (22). Estas uniones son dominios especializados de la membrana localizados en la región apical de los enterocitos. Son estructuras intercelulares, donde la membrana plasmática de la célula adyacente tiene contacto muy estrecho con la célula vecina. Las proteínas que forman estas uniones, son miembros de la familia de las claudinas y de las ocludinas (93). Cuando la ingesta de  $\text{Ca}^{2+}$  es adecuada o alta el proceso de absorción paracelular predomina en el yeyuno e íleon (21). Recientemente, Fujita y col (48) demostraron que el tratamiento con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  incrementa significativamente los niveles de ARNm de claudina 2 y 12 en células Caco-2 y que los niveles del ARNm y la expresión proteica de esas proteínas es significativamente más baja a las 12 semanas en el yeyuno de ratones carentes del receptor de vitamina D (RVD) comparados con ratones normales. Aunque estas observaciones sugieren que la vitamina D puede participar en la regulación de este proceso, el mecanismo de regulación de la absorción del  $\text{Ca}^{2+}$  por vía paracelular está en discusión (44).

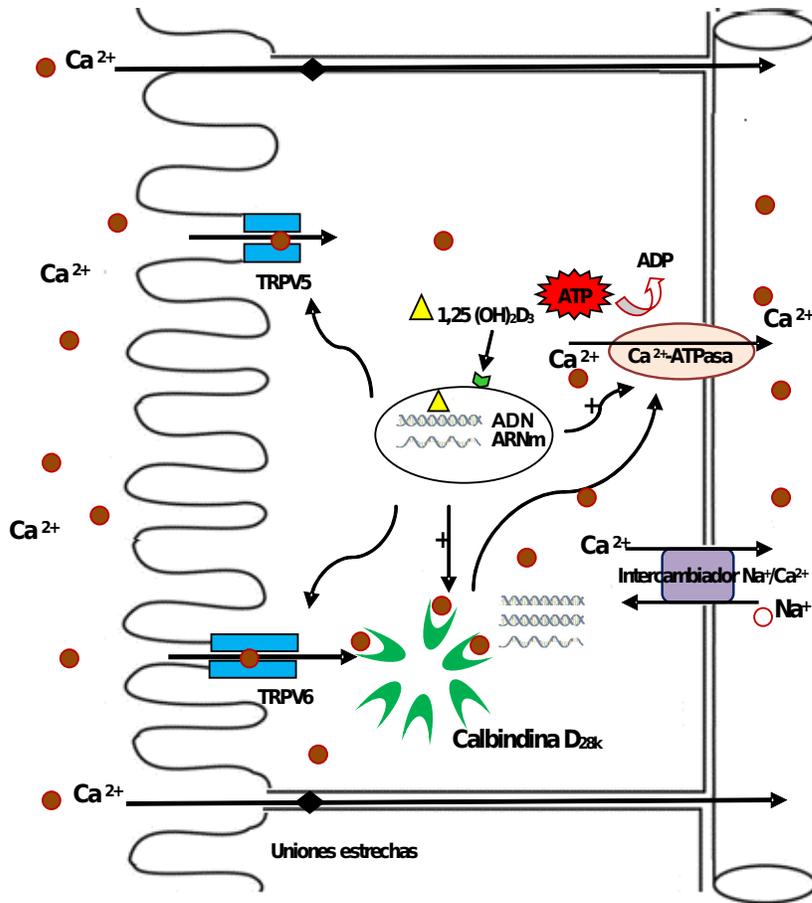
La vía transcelular es principalmente regulada por la vitamina D, a través de su metabolito activo el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , acción mediada por el RVD (106). Este proceso comprende tres etapas: 1) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del borde en cepillo de los enterocitos mediada a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , TRPV5 y TRPV6, 2)

desplazamiento de un polo hacia el otro de la célula, vía unión a calbindina  $D_{28k}$  en aves, o calbindina  $D_{9k}$  en mamíferos, y 3) salida por la membrana basolateral (MBL) de los enterocitos mediante activación de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa y del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Fig. 2).

La entrada de  $Ca^{2+}$  a nivel del borde en cepillo de los enterocitos se realiza a través de los canales TRP (receptores de potencial transciente). Estos son canales permeables a cationes que han sido subdivididos en seis grupos de acuerdo a la homología de su secuencia (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP y TRPML) (33, 87). Los TRPV5 y TRPV6 pertenecen a la familia *vanilloid* y son altamente selectivos para el transporte del  $Ca^{2+}$  iónico (114, 58). Desempeñan una importante función en el proceso de absorción del  $Ca^{2+}$  iónico ya que son expresados exclusivamente en órganos involucrados en el transporte transepitelial del catión (57, 92).

En concentraciones fisiológicas extracelulares, el  $Ca^{2+}$  iónico ingresa libremente a la célula a través de estos canales. A pesar de estas consideraciones, es controvertido cuál sería el transportador del  $Ca^{2+}$  responsable del ingreso del catión a la célula (40). El TRPV6 parece ser el candidato, ya que los ratones que no expresan el TRPV6 (TRPV6  $-/-$ ) presentan disminución de la absorción intestinal de calcio (aproximadamente 60 %), disminución en la densidad mineral ósea, menor fertilidad y deficiente ganancia de peso (15). Además, en ratones que no expresan RVD, el ARNm del TRPV6 de duodeno disminuye un 90% (44). Walters y col. (117) caracterizaron la expresión de TRPV6 en biopsias de duodeno humano normal, las cuales no fueron detectadas en íleon.

La expresión del TRPV6 duodenal fue dependiente de la vitamina D en los hombres, pero no en las mujeres mayores, en quienes la expresión de TRPV6 y de VDR fueron significativamente menores.



**LUMEN**

**SANGRE**

**Figura 2.** Representación esquemática de los posibles mecanismos involucrados en la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ . El transporte intestinal del  $\text{Ca}^{2+}$  transcurre por vía paracelular y transcelular. La vía paracelular se produce a través de las uniones estrechas a favor de un gradiente electroquímico. La vía transcelular comprende tres etapas: 1) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del borde en cepillo de los enterocitos, mediada a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , conocidos como TRPV5 y TRPV6, 2) desplazamiento de un polo hacia el otro de la célula, vía unión a calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$  en aves, o calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$  en mamíferos, y 3) salida por la membrana basolateral de los enterocitos mediante activación de la  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPasa y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se une con su receptor e interactúa con el ADN en secuencias específicas induciendo la transcripción y el aumento de la expresión de TRPV5/6, calbindinas y proteínas involucradas en la salida del catión por la MBL.

La proteína citoplasmática protagonista del desplazamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  de un polo hacia el otro en el enterocito es la calbindina D (CB) la cual se une al catión. Hay dos formas de CB, una forma de 9 kDa que se halla en intestino de mamíferos y riñón de ratón (calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$ ,  $\text{CB}_{9\text{k}}$ ) y una forma de 28 kDa presente en intestino y en riñón de aves y en riñón de mamíferos (calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$ ,  $\text{CB}_{28\text{k}}$ )

(44). Ambas proteínas son codificadas por distintos genes. Se ha propuesto que CB no solo se encarga del transporte de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  del extremo apical hacia la MBL del enterocito, sino que también CB actuaría como un *buffer* intracelular (limitando las acciones del catión como segundo mensajero durante el proceso de transporte) (93).

Las CB son proteínas pequeñas que poseen un dominio estructural tipo mano EF, con capacidad de unir 2 ( $\text{CB}_{9k}$ ) o 4 ( $\text{CB}_{28k}$ ) moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de proteína (32). Los niveles de CB se correlacionaron positivamente con la absorción de calcio (20). En animales deficientes en vitamina D y en ratones que no expresan RVD, los niveles de CB en intestino se redujeron significativamente (111, 119). Además, el tratamiento con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentó significativamente la expresión de CB en duodeno, lo cual sugiere que CB podría ser un gen blanco de la vitamina D (19). Por otro lado, la alteración en la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a CB por el tratamiento con teofilina, en sacos duodenales evertidos de ratas, afectó la absorción intestinal de calcio (89). Estos hallazgos sugieren que CB son proteínas que participan en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  ya sea por actuar como *buffer* intracelular o como transportadores del calcio desde la membrana apical a la MBL del enterocito (43).

El proceso de salida del  $\text{Ca}^{2+}$  por la MBL de los enterocitos es realizado por dos moléculas, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática o bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa está ubicada en pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (7). Existen varias isoformas, la más abundante en intestino es la isoforma 1b. La expresión de esta proteína es mayor en enterocitos maduros del ápice de la vellosidad comparada con la de los enterocitos de la cripta de la vellosidad, por lo tanto los enterocitos maduros

tendrían más capacidad para el movimiento transcelular del  $\text{Ca}^{2+}$  (29). La deficiencia de vitamina D disminuyó la expresión y actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en intestino de pollo, efecto que fue parcialmente revertido por una simple dosis de colecalciferol (4).

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es responsable de alrededor del 20% de la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  del enterocito y su actividad depende del gradiente creado por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (50). Esta proteína intercambia 3  $\text{Na}^+$  por 1 $\text{Ca}^{2+}$  (73) y puede actuar en ambos sentidos (entrada o salida del catión), dependiendo del gradiente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y del potencial a través de la membrana plasmática (17). La expresión y actividad es similar en enterocitos inmaduros y maduros, manifestándose un leve aumento en células del ápice de la vellosidad (29).

Cuando la ingesta del  $\text{Ca}^{2+}$  en la dieta es alta, el transporte transcelular contribuye poco a la absorción total del  $\text{Ca}^{2+}$  en intestino, momento en que el transporte paracelular comienza a cobrar importancia, debido a que el tiempo de permanencia del catión en el intestino es corto y las proteínas involucradas en la vía transcelular están disminuidas (23).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que algunas de las moléculas que participan en la vía transcelular de absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  son sensibles a estrés oxidativo y, como consecuencia, se produce inhibición de la absorción intestinal del catión. Tolosa de Talamoni y col. (109) demostraron que el DL-butionina-S,R-sulfoximina (BSO) produce inhibición de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ , la actividad de fosfatasa alcalina intestinal (FAI) y de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en pollos deficientes en vitamina D tratados con colecalciferol, pero no en animales D-deficientes. El aumento en la actividad de la FAI producida por la vitamina D se

inhibió por la administración de BSO, efecto que fue dependiente del tiempo y de la dosis. El BSO es un inhibidor específico de la  $\gamma$ - glutamilcisteína sintetasa, produce disminución de la síntesis endógena de glutatión (GSH) y selectivamente produce depleción del GSH intracelular. La principal función del GSH está vinculada a su poder reductor, el cual contribuye a mantener en estado reducido los grupos sulfhidrilos de proteínas y constituye una defensa contra las especies reactivas del oxígeno. Marchionatti y col. (79, 80) demostraron que una única dosis de menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona, vitamina K<sub>3</sub>) (MEN) altera el equilibrio redox en los enterocitos, provocando efectos no deseados sobre la absorción intestinal de Ca<sup>2+</sup> y variables asociadas, lo cual puede ser prevenido por la administración oral de monoéster de GSH. Además, MEN provoca disfunción mitocondrial, como se manifestó por la liberación del citocromo c y la fragmentación del ADN, llevando a la inhibición de la absorción intestinal de Ca<sup>2+</sup>. La toxicidad de MEN se ha atribuido al estrés oxidativo porque en su ciclo metabólico genera depleción de GSH que induce la formación de ROS.

Aunque es bien conocido que los AB hidrofóbicos producen estrés celular, hay muy poca información sobre el efecto de los AB sobre el proceso general de la absorción intestinal de calcio y menos aún sobre el rol del DXCS, el cual se encuentra en gran proporción en el agua fecal del intestino humano (83).

En base a las consideraciones previas, surgió la hipótesis que postula que el DXCS, en concentraciones fisiológicas altas, podría alterar la absorción intestinal de Ca<sup>2+</sup>, quizás por desencadenamiento de estrés oxidativo que estimularía los procesos apoptóticos de las células epiteliales, resultando en una disminución de la capacidad de transporte del catión.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Conocer los mecanismos moleculares que pueden desencadenar altas concentraciones de DXCS en el duodeno y sus implicancias sobre la absorción intestinal de calcio.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Estudiar la histología del intestino en presencia y ausencia de la sal biliar.
- Evaluar el efecto del DXCS sobre la expresión de genes relacionados con la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Analizar la expresión de proteínas que participan en la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  tales como  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , calbindina  $\text{D}_{28\text{K}}$ .
- Estudiar el efecto del DXCS sobre el sistema redox intestinal, a través de la cuantificación del contenido de glutatión, la medición de radicales libres hidroxilo y de actividades de las enzimas del sistema antioxidante.
- Identificar el efecto del DXCS sobre la integridad de la membrana interna mitocondrial.
- Determinar en presencia y ausencia de DXCS la localización del citocromo c y la fragmentación del ADN como indicadores de apoptosis.
- Analizar el efecto de un antioxidante sobre la absorción intestinal del catión en presencia de la sal biliar.
- Interpretar los posibles mecanismos moleculares desencadenados por el DXCS que podrían afectar el proceso global de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## Capítulo 2

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **Animales**

Se utilizaron pollos variedad "Cobb" (INDACOR S.A., Río Ceballos, Córdoba) como animales de experimentación, los cuales fueron alimentados desde su nacimiento con una dieta comercial normal. Los animales se criaron durante cuatro semanas en un bioterio con luz artificial a 25°C y con un fotoperíodo de luz-oscuridad de 12 y 12 horas, respectivamente. Finalizadas las cuatro semanas de

edad los pollos se dividieron en dos grupos: a) controles y b) tratados con deoxicolato de sodio (DXCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en el lumen intestinal a diferentes tiempos y concentraciones como se indica en la sección resultados.

A los pollos se les practicó laparotomía bajo anestesia y un segmento de 10 cm de duodeno se ligó en ambos extremos como previamente se describió (109). En el lumen intestinal se colocó con una jeringa una solución que contenía 1 mL de *buffer* fosfato salino (PBS, vehículo), o DXCS.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y el duodeno se extrajo inmediatamente, el cual se lavó con solución fisiológica fría y se utilizó para: 1) análisis histológico, 2) aislamiento de enterocitos, 3) purificación de mitocondrias, 4) obtención de mucosa para la medición de actividades enzimáticas, 5) determinación de la expresión génica y proteica.

### **Transferencia de $\text{Ca}^{+2}$ desde el lumen intestinal al plasma sanguíneo**

Después de la inyección de vehículo o DXCS en el lumen intestinal ligado por el tiempo que dura el tratamiento, el duodeno se lavó con solución fisiológica fría y se colocó 1 mL de NaCl 150 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L conteniendo 4  $\mu\text{Ci}$  de  $^{45}\text{Ca}$ , pH 7,2. Luego de 30 minutos se extrajo sangre por punción cardíaca, se centrifugó a 1000 x g y en 100  $\mu\text{L}$  de plasma se midió en líquido de centelleo el  $^{45}\text{Ca}$  en un contador Beckman LS 6500 (Fulleton, CA, USA). La absorción se definió como la aparición de  $^{45}\text{Ca}$  en plasma, la cual se expresó en nmol de  $\text{Ca}^{+2}$  transferido/mL de plasma (109). Experimentos similares se hicieron cuando se inyectó DXCS conjuntamente con 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina (QT) o QT sola a esta misma concentración.

## **Aislamiento de células epiteliales intestinales**

Para los experimentos realizados “in vitro” se aislaron células epiteliales (enterocitos maduros) de duodeno de pollo utilizando el método de Walters y Weiser (116). Se removió el duodeno de la cavidad abdominal del pollo y se llenó el saco intestinal luego de evertido con una solución que contenía NaCl 120 mmol/L, KCl 10 mmol/L, glucosa 10 mmol/L, EDTA-Na 0,5 mmol/L, fosfato disódico 12 mmol/L (*buffer A*). Se incubó 15 minutos a 37°C en un vaso de precipitado conteniendo 10 ml de una solución que tenía citrato trisódico 27 mmol/L, NaCl 66 mmol/L, KCl 10 mmol/L, glucosa 10 mmol/L, ditioneitol 1 mmol/L, fosfato disódico 10 mmol/L (*buffer B*). Posteriormente, se descartó la solución contenida en el vaso de precipitado y se reemplazó por el *buffer A*, con ditioneitol 0,5 mmol/L. Se incubaron los sacos intestinales durante 20 minutos a 37°C con agitación suave. Las células en suspensión se obtuvieron por centrifugación a 500 x g a 4°C por 5 minutos. Las células recolectadas se resuspendieron en 1 mL de una solución que contenía KCl 140 mmol/L, HEPES 10 mmol/L pH 7,4 (*buffer C*). Esta operación se repitió dos veces. La viabilidad celular se evaluó con la técnica de exclusión del Tripan blue.

## **Determinación de proteínas**

En cada uno de los experimentos se determinó la concentración de proteínas totales mediante el empleo del reactivo de Biuret (52).

## **Aislamiento de mitocondrias intestinales**

A partir de mucosa duodenal de ambos grupos de animales (controles y tratados) se aislaron mitocondrias por centrifugación diferencial. La mucosa se colocó en un beaker con medio de aislamiento que contenía manitol 0,23 mol/L, sacarosa 0,07 mol/L, EDTA 1 mmol/L, TRIS-HCl 5 mmol/L, pH 7,4 (relación 1:9). Se homogeneizó y centrifugó a 700 x g para eliminar núcleos, restos celulares y otros componentes pesados. Las mitocondrias se sedimentaron a 7000 x g durante 10 minutos y se lavaron con el mismo medio de aislamiento libre de EDTA. Se homogeneizaron con medio de aislamiento (relación 1:2) y se midieron las proteínas, como se describió anteriormente.

### **Medición de Actividades Enzimáticas**

Todas las actividades enzimáticas se midieron en sobrenadante de homogeneizado de mucosa duodenal.

#### **Actividad de Fosfatasa Alcalina Intestinal EC 3.1.3.1 (FAI)**

La actividad de la enzima se determinó en una alícuota de homogeneizado diluida en agua (1:10) en presencia de p-nitro-fenilfosfato 3 mmol/L como sustrato diluido en 0,5 mL de *buffer* de dietanolamina pH 9,8, de acuerdo al método de Walter y Schutt (115).

#### **Actividad de Superóxido dismutasa EC 1.15.1.1 (Mg<sup>2+</sup>- SOD)**

Se extrajo mucosa de duodeno de pollo y se homogeneizó con *buffer* de extracción (1:5) (*buffer* fosfato de potasio 50 mmol/L más EDTA 1 mmol/L, pH 7,5). Se centrifugó una alícuota del homogeneizado a 14000 rpm a 4°C por 30 minutos. En el sobrenadante se determinó la actividad en EDTA 1 µmol/L, *buffer* fosfato de

potasio 50 mmol/L pH 7,8, metionina 13 mmol/L, nitro azul de tetrazolio (NBT) 75  $\mu$ mol/L y riboflavina 40  $\mu$ mol/L (11). Los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

#### **Actividad de Catalasa EC 1.11.1.6 (CAT)**

En otra alícuota del sobrenadante en el que se midió la actividad de Mg<sup>2+</sup>-SOD, se determinó la actividad de CAT en *buffer* fosfato de potasio 50 mmol/L pH 7,4 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mol/L (1). Los resultados se expresaron en U/mg proteína.

#### **Actividad de Glutación peroxidasa EC 1.11.1.9 (GPx)**

En otra fracción del sobrenadante donde se determinó la actividad de CAT y SOD se midió la actividad de GPx, para lo cual se utilizó *buffer* fosfato de potasio 50 mmol/L pH 7,8, EDTA 1 mmol/L, NaN<sub>3</sub> 1 mmol/L, glutación 1 mmol/L y 1 U de glutación reductasa (31). Los resultados se expresaron en mU/mg de proteína.

#### **Determinación del contenido total de Glutación (GSH)**

El contenido de GSH total se midió en una alícuota diluida de homogeneizado de mucosa duodenal en ácido 5-sulfosalicílico 5% p/v (1:5) de acuerdo con el método de Anderson (6), usando disulfuro de GSH reductasa-5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) diluido 1:10 con *buffer* fosfato, en presencia de NADPH. El contenido total de GSH se expresó como nmol/mg de proteína.

#### **Determinación de radicales libres hidroxilos**

Se utilizó la técnica del atrapador de *spin* (30), para identificar radicales libres hidroxilos en células del ápice de la vellosidad intestinal, incubadas con DXCS 10 mmol/L a 37°C durante 30 minutos con agitación constante. Se utilizó óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina (DMPO) 0,1 mol/L como atrapador de *spin* y el espectro de resonancia electrónica del *spin* (ESR) se midió a temperatura ambiente con un espectrómetro de ESR (Bruker ECS 106, cavidad ER4102st; Kalkar, Alemania). Estos experimentos se realizaron en la Cátedra de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

### **Evaluación de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (*swelling*)**

Mitocondrias aisladas de mucosa intestinal (3mg de proteína) se incubaron durante 10 minutos a 25°C con 3 mL de *buffer* de respiración (NaCl 0,1 mol/L, MOPS 10 mmol/L, glutamato 1 mmol/L, malato 1 mmol/L, pH 7,4). Se midió la absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640 (Brea, CA, USA). La absorbencia basal de las mitocondrias se midió durante 5 minutos y luego de la adición de concentraciones crecientes de DXCS (0,1- 1,0 mmol/L) en los siguientes 5 minutos (100).

### **Análisis histológicos**

Se fijaron segmentos de duodeno de pollo en paraformaldehído 4% diluido en *buffer* fosfato de sodio 0,01 mol/L pH 7,3 y se analizaron secciones de 5 µm de

espesor. La morfología del intestino se observó por tinción con hematoxilina-eosina. Se determinó la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL (ApoptTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis detection kit, Chemicon Int., Temecula, CA, USA). La magnitud de la apoptosis se determinó a través del índice apoptótico, expresado como porcentaje de células TUNEL positivas en relación con el número total de células. El índice apoptótico se calculó contando las células TUNEL positivas, al menos en 10 vellosidades de 3 animales para cada uno de los tratamientos.

La localización de calbindina D<sub>28k</sub> (CB<sub>28k</sub>) se analizó en secciones intestinales mediante la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando un anticuerpo policlonal anti CB<sub>28k</sub> producido en conejo (C7354, KD-15, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), que se diluyó 1:1000 y se aplicó a 37°C durante 1 h. La detección de la actividad de peroxidasa se realizó utilizando DAB como cromógeno y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. El mismo procedimiento sin el anticuerpo primario, se utilizó en las secciones controles. La visualización se llevó a cabo con un microscopio Leica DM (10x/0,25 y 40x/0,65 N objetivos del Plan) y las imágenes se obtuvieron con una cámara Leica DC180 (software Leica IM50 Image Manager).

### **Expresión de proteínas por Western blot**

En mucosa duodenal de pollo se analizaron las expresiones de intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>(NCX1), Ca<sup>+2</sup>-ATPasa (PMCA<sub>1b</sub>), calbindina D<sub>28k</sub> (CB<sub>28k</sub>) y citocromo c. NCX1, PMCA<sub>1b</sub> y CB<sub>28k</sub> se analizaron en *pool* de suspensiones de

homogeneizados de mucosa duodenal de tres animales por tratamiento, mientras que el citocromo c se analizó en las fracciones mitocondrial y citosólica obtenidas por centrifugación diferencial (108). Las suspensiones se realizaron en *buffer* de lisis RIPA (*radio immuno precipitation assay buffer*) que contenía SDS 0,1%, deoxicolato de sodio 0,5% en PBS 1X, PMSF 1mmol/L y NaF 1 mmol/L. Posteriormente se sometieron a centrifugación. Para la separación electroforética, 100 µg de proteínas se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos. Las proteínas se separaron en un minigel de SDS-poliacrilamida 12 % (para el análisis de citocromo c y CB<sub>28k</sub>) y 8 % (para el análisis de NCX1 y PMCA<sub>1b</sub>) (71). Los geles con las proteínas separadas se sumergieron en *buffer* de transferencia (TRIS-HCl 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L, SDS 0,05% p/v y metanol 20% v/v) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (110). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 2% en *buffer* TRIS salino por 1 hora y después de varios lavados con TRIS salino se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico para cada una de las proteínas (dilución de 1:1000). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti citocromo c (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, USA), anticuerpo monoclonal anti NCX1 PPS019 (R&D System, Minneapolis, MN, USA), anticuerpo monoclonal anti PMCA<sub>1b</sub> (human erythrocyte clone 5F10 A7952. Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) y anticuerpo policlonal anti CB<sub>28k</sub>, producido en conejo, (C7354, KD-15, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Después de tres lavados, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado a temperatura ambiente por 1 hora, luego se lavaron tres veces con TRIS salino y se les agregó el conjugado biotina – streptoavidina (Zymed Laboratorios Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

La detección se realizó usando el cromógeno 3,3'- diaminobenzidina (DAB). Se usó el anticuerpo monoclonal anti GAPDH, clone GAPDH-71.1 (Sigma Saint Louis, Missouri, USA) para analizar la expresión de la proteína GAPDH utilizada como marcador para normalizar la expresión relativa de las otras proteínas. En los Western blot de citocromo c se tiñeron las membranas con rojo Ponceau para confirmar igual carga de proteínas en cada una de las calles de siembra. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó mediante el uso del sistema Image Capturer EC3 Imaging System, Launch Visionworks software, para obtener la expresión relativa de las proteínas. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densitometría.

### **Extracción de ARN y análisis de la expresión génica de *ncx1*, *cb* y *pmca<sub>1b</sub>* por RT-PCR**

Para la extracción de ARN total se utilizó TRIZOL (Invitrogen, Carisbad, CA, USA). La concentración y pureza del ARN se determinó por espectrofotometría (49). Para obtener los ADNc se realizó la retrotranscripción mediante el uso de 400 unidades de transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Carisbad, CA, USA) en *buffer* (TRIS-HCl 50 mmol/L, pH 8,3, KCl 75 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L, dithiothreitol 20 mmol/L), deoxinucleótido trifosfatos 2mmol/L, 40 unidades de inhibidor de ARNasa (RNaseOUT, Invitrogen, Carisbad, USA) y 500 ng de *random primers*. Los ADNc se amplificaron por PCR utilizando los siguientes cebadores: 1) gen *ncx1*: directo 5'-GACTGTTTCCAACCTCACAC-3', reverso 5'-TAGCAACCTTTCCGTCCATC-3'. El producto amplificado fue un fragmento de 494 pares de bases (pb), 2) gen *pmca<sub>1b</sub>*: directo 5'-GCCATCTTCTGCACAATTGT-

3', reverso 5'-TCAGAGTGATGTTTCCAAAC-3'. El amplicón contenía 630 pb. 3) gen de *cb*: directo 5'-TACGATCAAGATGGCAATGG-3', reverso 5'-CAGACTGGCCCAAACATAGA-3'. Se amplificó un fragmento de 642 pb. Las condiciones de amplificación para los genes fueron: 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 59°C y 1 minuto de extensión a 72°C cada ciclo, seguidos de 10 minutos a 72°C de extensión final. La expresión de todos los genes en cada muestra se comparó con la expresión del ARNr 18 S como control interno. La secuencia de los cebadores para amplificar un segmento de 18S fueron: directo 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' y reverso 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'. El amplicón contenía fragmentos de 131 pb. Los productos de amplificación de cada PCR se resolvieron en gel de agarosa (2%) preteñido con bromuro de etidio y posteriormente examinado con luz UV. La cantidad de cada uno de los ARNm se normalizó en relación con la expresión del 18S para cada una de las muestras.

### **Análisis de la expresión génica de *pmca<sub>1b</sub>* por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)**

Se aisló y cuantificó ARN como se describió en la sección anterior. La RT-qPCR se realizó en un termociclador de tiempo real (Quantitative PCR thermocycler Stratagene Mx 3000P, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, USA). La mezcla de amplificación (volumen final: 25 µL) contenía: 0,5 µg ARN, 0,3 µL de cada uno de los cebadores 500 nM, 0,4 µL del colorante de referencia diluido (Stratagene, Inc, Santa Clara, USA), 1,0 µL de la mezcla que contenía la

transcriptasa inversa (RT) y la enzima bloqueante de RNAsas y 12,5  $\mu$ L de 2X de Brilliant II SYBR Green QRT-PCR master mix (Stratagene, Inc, Santa Clara, USA).

Se usó el siguiente protocolo de amplificación: 1 ciclo de 30 min. a 50 °C, 1 ciclo de 10 min. a 95°C, 40 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridización a 60 °C por 60 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Se evaluó la cantidad de producto formado en cada ciclo por la fluorescencia producida por el SYBR Green.

Los cebadores fueron: directo 5'-GTTGTGCAGATAATTATGCTGC-3' y reverso 5'-GGAATTTCAAGCGGCTAGTTGG -3', el producto de amplificación fue de 120 pb. La emisión de fluorescencia leída ciclo a ciclo fue monitoreada y cuantificada por el método  $\Delta\Delta C_t$ . (67)

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ER. En algunos experimentos se realizó análisis de varianza a una vía (ANOVA) y *test* de Bonferroni para comparaciones múltiples *post hoc* y en otros experimentos, Kruskal-Wallis, para análisis de datos no paramétricos. Las diferencias con un valor de  $p < 0,05$  se consideraron significativas.

## Capítulo 3

# RESULTADOS

### **Efecto del DXCS sobre la absorción intestinal de $\text{Ca}^{2+}$ a diferentes tiempos**

La administración de DXCS 20 mM en el lumen intestinal produjo disminución de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  a los 15 minutos, efecto que perduró por 30 y 60 minutos en comparación con sus respectivos controles (Fig.3). En los controles de 60 minutos los niveles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  /mL de plasma fueron menores que los controles 15 y 30 minutos debido a la mayor distribución del catión desde la sangre a los diferentes tejidos y al daño producido por la ligadura del duodeno a las células epiteliales como lo reveló el análisis de la morfología del tejido. Por lo tanto, los experimentos posteriores se realizaron a tiempos de 15 y 30 minutos de tratamiento.

### **Efecto de diferentes concentraciones de DXCS sobre la absorción intestinal de $\text{Ca}^{2+}$**

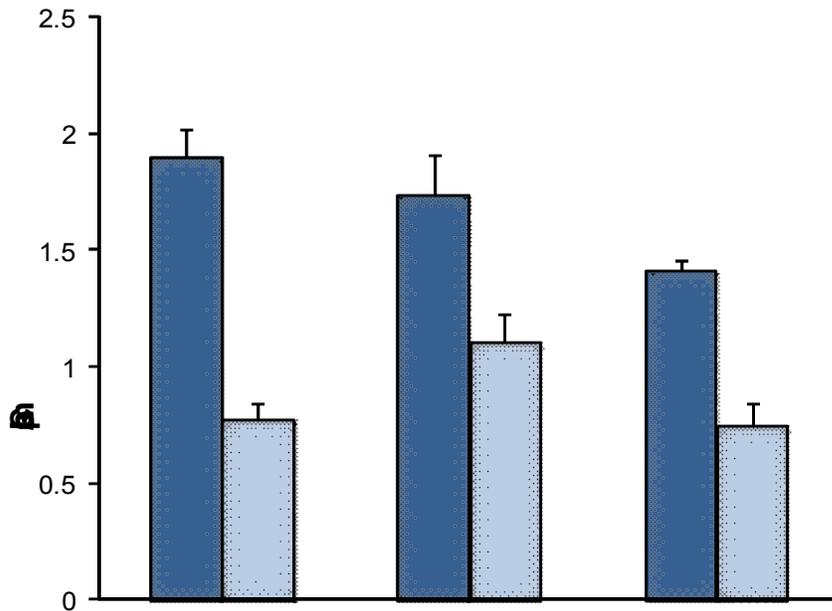
Se estudió el efecto de la concentración intraluminal del DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  después de 30 min. de tratamiento. Los datos mostraron que la reducción en la absorción del catión fue dependiente de la concentración del DXCS (Fig.4). La concentración de DXCS 1 mM no afectó la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la de 10 mM disminuyó significativamente la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ , efecto que fue alrededor del doble con DXCS 100 mM. Con estos datos se eligió la concentración de DXCS 10 mM para los sucesivos experimentos.

## **Análisis de la morfología del intestino por tinción con hematoxilina /eosina**

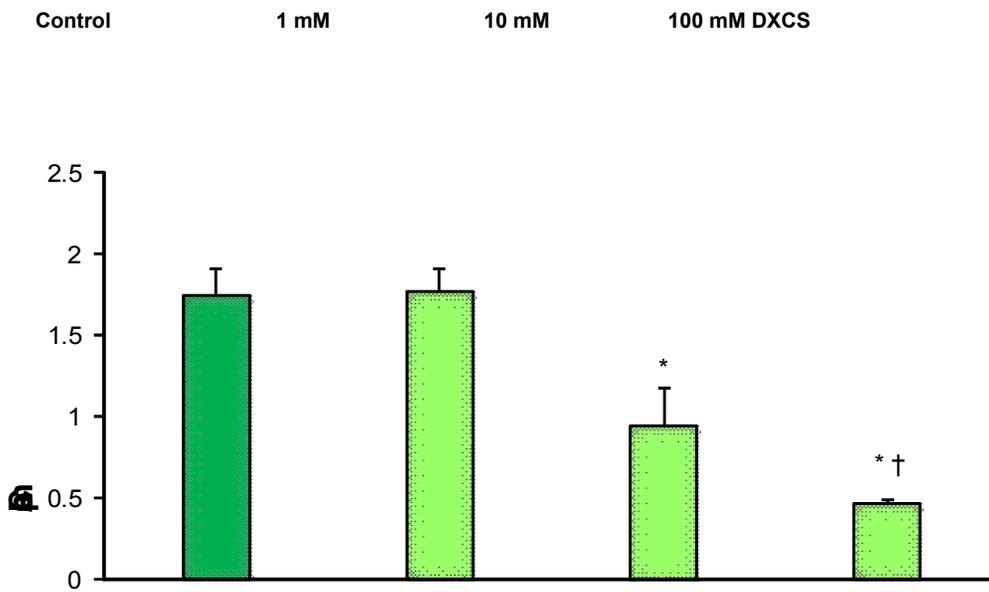
El análisis morfológico del tejido intestinal se realizó tanto en los animales controles como en los tratados con DXCS 10 mM. Se observó que los controles de 60 min. presentaron ligera desorganización tisular con duplicación epitelial y zonas centrales con edema, además se observaron zonas con ausencia de borde en cepillo (chapa estriada) y algunas células caliciformes se presentaron sin coloración. El tratamiento con DXCS durante 60 min. mostró una capa de enterocitos con alteraciones morfológicas: los núcleos presentaron tinción anormal y formas pequeñas, y engrosamiento de los citoplasmas en zona apical y basal. Se observaron células caliciformes con tinción oscura posiblemente compatibles con acúmulos de mucoproteínas. Además se presentó engrosamiento de la chapa estriada. En la zona estromal se encontró aumento de vasos linfáticos y de capilares. Por lo tanto el modelo experimental utilizado para el estudio produjo, a los 60 min. daño de las células del epitelio intestinal, razón por la cual se trabajó a tiempos más cortos de 15 y 30 min. (Fig.5)

	15 min	30 min	60 min
*			
*			
*			
†			
<b>Control</b>			

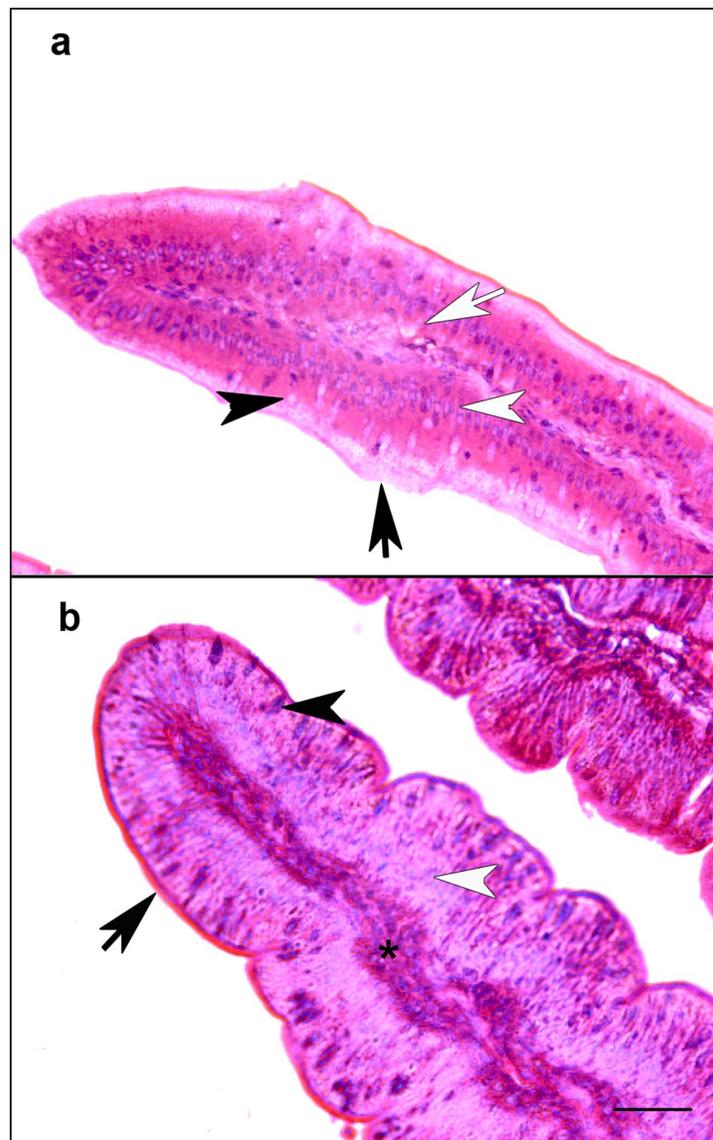
Tratado



**Figura 3.** Efecto de DXCS 20 mM sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferentes tiempos. Los valores son las medias  $\pm$  ES de 7 determinaciones independientes. \*  $p < 0,05$  vs Control respectivo, †  $p < 0,05$  vs Controles 15 y 30 min.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  al cabo de 30 min. de tratamiento. Los valores son las medias  $\pm$  ES de 4 determinaciones independientes.\*  $p < 0,05$  vs Control, †  $p < 0,05$  vs tratamientos con DXCS 1 y 10 mM.

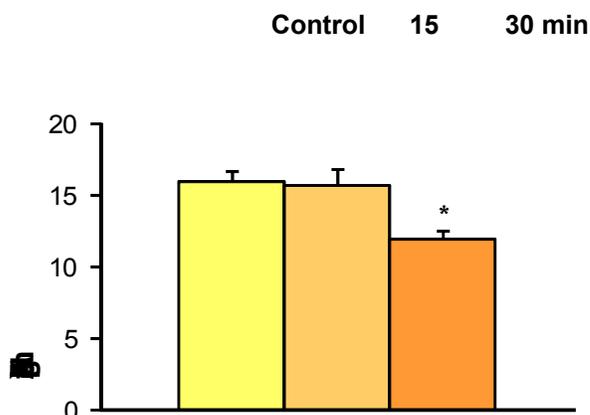


**Figura 5.** Morfología del tejido intestinal en animales controles y tratados con DXCS 10 mM a 60 min. Tinción hematoxilina-eosina. **a)** Vellosidad intestinal de animal control. Se observa ligera desorganización tisular con duplicación epitelial (cabeza de flecha blanca) y zonas centrales con edema (flecha blanca). Se observan zonas con ausencia de borde en cepillo (chapa estriada, flecha negra). Las células caliciformes se presentan sin coloración (cabeza de flecha negra). **b)** Vellosidad intestinal de animal tratado con DXCS. Se muestra una capa de enterocitos con alteraciones morfológicas: los núcleos presentan tinción anormal y formas pequeñas (punta de flecha blanca) y engrosamiento en zona apical y basal de los citoplasmas. Se observan células caliciformes con tinción oscura posiblemente compatibles con acúmulos de mucoproteínas (cabeza de flecha negra). Hay engrosamiento de la chapa estriada (flecha negra). En el estroma se observa aumento de vasos linfáticos y capilares (asterisco). Amplificación 40 x. La barra de magnificación corresponde a 20  $\mu$ m.

## **Efecto del DXCS sobre la actividad de fosfatasa alcalina intestinal**

En sobrenadante de homogeneizado duodenal se estudió la actividad de fosfatasa alcalina intestinal (FAI), enzima de membrana del borde en cepillo del enterocito y que presumiblemente está involucrada en la absorción intestinal de

Ca<sup>2+</sup>. La administración de DXCS 10 mM en el lumen del duodeno del pollo, disminuyó significativamente la actividad de FAI a los 30 min. de tratamiento (Fig. 6).



**Figura 6.** Efecto del DXCS 10 mM sobre la actividad de fosfatasa alcalina intestinal (FAI) en sobrenadante de mucosa duodenal. Los valores son expresados como las medias  $\pm$  ES de 7 determinaciones independientes. \*  $p < 0,05$  vs Control y tratamiento con DXCS 15 min.

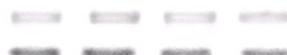
## EFFECTO DEL DXCS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA VÍA TRANSCELULAR DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO

## Efecto del DXCS sobre la expresión génica de intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (*ncx1*),  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa (*pmca1b*), calbindina  $\text{D}_{28k}$  (*cb*)

*cb* 642 pb

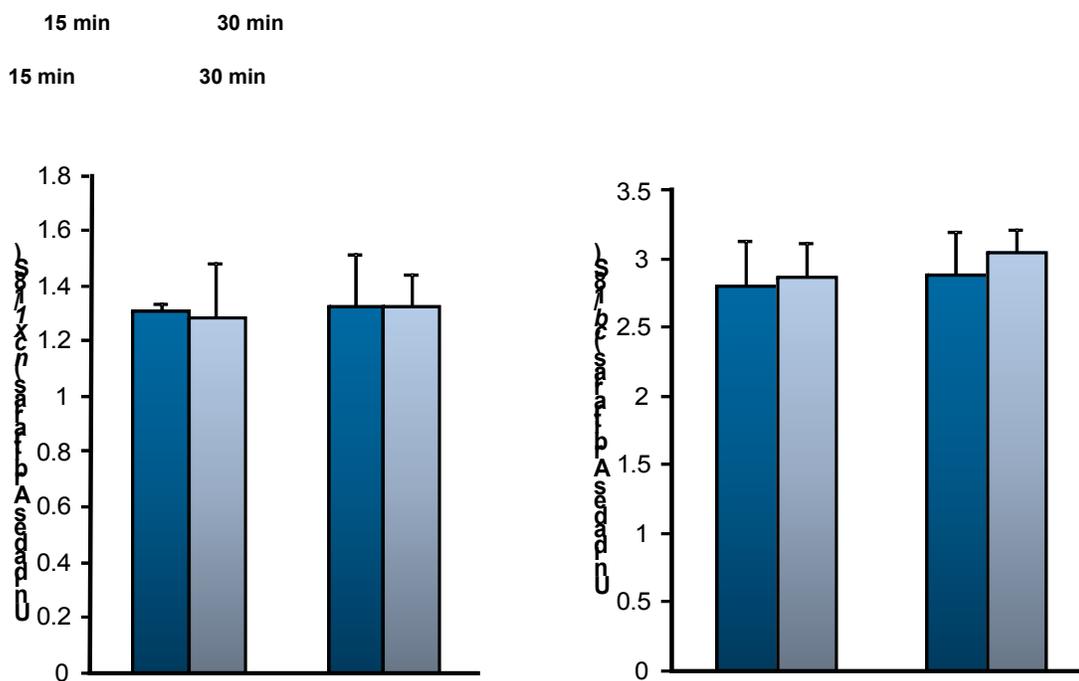
18 S 131 pb



*ncx1* 490 pb

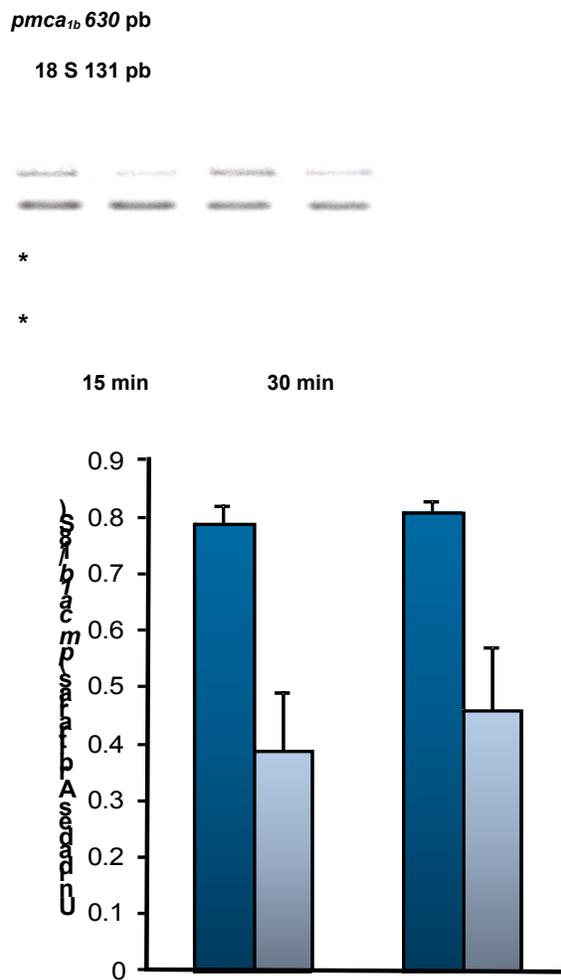
18 S 131 pb

Con el propósito de conocer si el DXCS podría afectar los principales transportadores involucrados en la vía transcelular de la absorción del  $\text{Ca}^{+2}$ , se estudió la expresión génica de *ncx1*, *cb* y *pmca1b*, por RT-PCR. El tratamiento con DXCS 10 mM no modificó los niveles del ARNm del *ncx1* y *cb* en los tiempos estudiados (Fig.7).



**Figura 7.** Efecto de DXCS 10 mM sobre la expresión del ARNm de *ncx1* y *cb* en mucosa de duodeno de pollo. Controles y Tratados. Arriba el panel de las RT-PCR y abajo el análisis densitométrico de las bandas. Los valores se expresaron como las medias  $\pm$  ES. Se realizaron tres experimentos independientes.

El análisis de los niveles de ARNm de *pmca<sub>1b</sub>* por RT-PCR reveló que el tratamiento con DXCS 10 mM disminuyó la expresión del ARNm a los 15 y 30 min. de tratamiento (Fig.8).



\*

**Figura 8.** Efecto de DXCS 10 mM sobre la expresión del ARNm de *pmca<sub>1b</sub>* en mucosa de duodeno de pollo. Control y Tratado. Arriba el panel de la RT-PCR y abajo el análisis densitométrico de las bandas (Unidades Arbitrarias: *pmca<sub>1b</sub>/18S*). Los valores se expresaron como las medias  $\pm$  ES. \*  $p < 0,05$  vs control respectivo. Se realizaron tres experimentos independientes.

La disminución de la expresión del ARNm de *pmca<sub>1b</sub>* producida por la sal biliar se confirmó por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). Los valores obtenidos fueron: *pmca<sub>1b</sub>/18S*, media  $\pm$  ES: control<sub>15 min</sub>:  $1,00 \pm 0,14$ ; tratado con DXCS<sub>15 min</sub>:  $0,19^* \pm 0,01$ , \*  $p < 0,01$ ; control<sub>30 min</sub>:  $1,00 \pm 0,21$ ; tratado con DXCS<sub>30 min</sub>:  $0,36^\dagger \pm 0,11$ ,  $^\dagger p < 0,05$ ).

### **Efecto del DXCS sobre la expresión proteica de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> y calbindina D<sub>28k</sub>**

Para definir si los cambios en el ARNm se correlacionaban con la expresión de sus proteínas, se determinó en homogeneizado de mucosa duodenal la expresión de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> y calbindina D<sub>28k</sub> por Western blot. El tratamiento con DXCS 10 mM no alteró la expresión de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa a los 15 min. pero la disminuyó a los 30 min., mientras que las expresiones del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> y de la calbindina D<sub>28k</sub> disminuyeron por el tratamiento a los 15 min. de tratamiento permaneciendo aún baja a los 30 min. (Fig.9).

Aunque la expresión de calbindina  $D_{28k}$  disminuyó con el tratamiento la inmunolocalización de la proteína, analizada por inmunohistoquímica, no se modificó (Fig.10).

**Ca<sup>2+</sup>-ATPasa (140 kDa)**

**GAPDH (37 kDa)**

**int. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> (120 kDa)**

**GAPDH (37 kDa)**

\*

\*

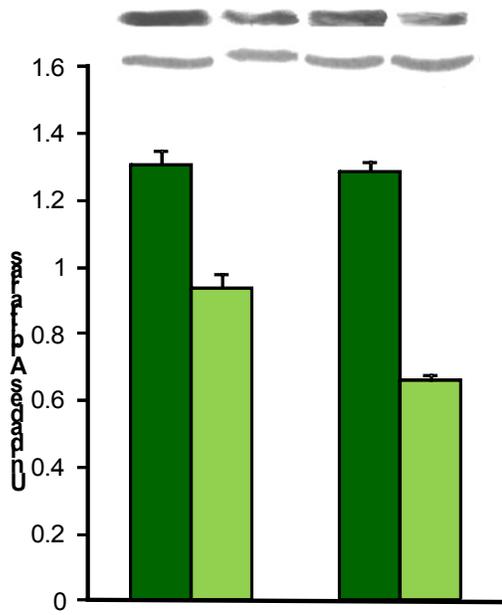
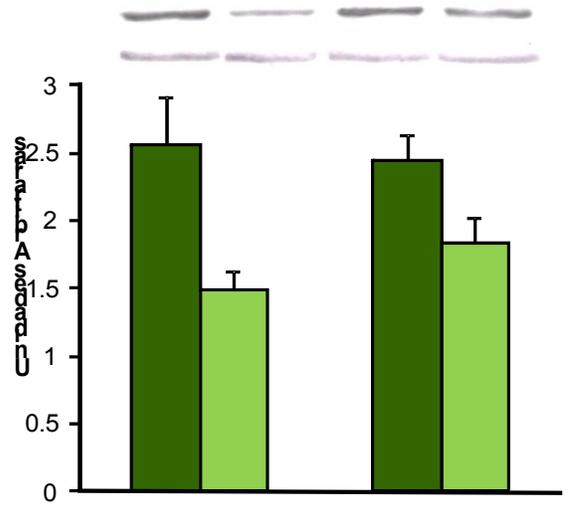
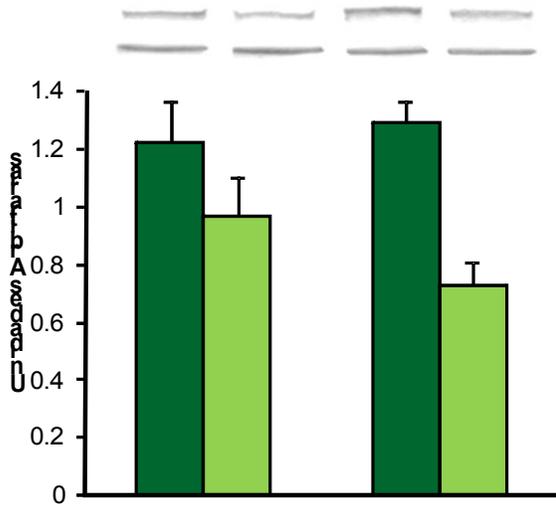
\*

15 min

30 min

15 min

30 min



\*

\*

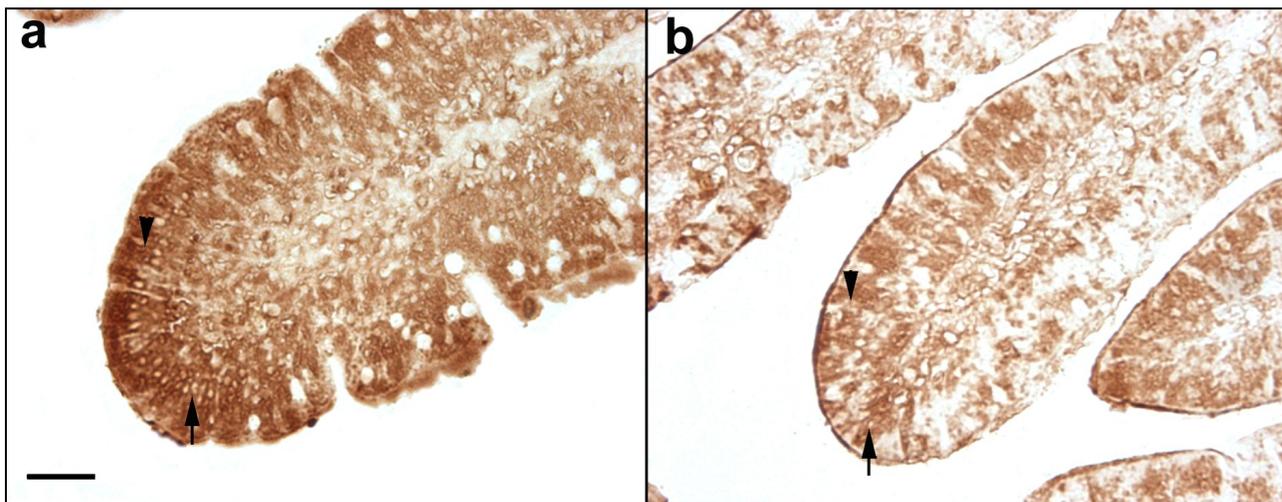
15 min

30 min

calbindina<sub>28k</sub> (28 kDa)

GAPDH (37 kDa)

**Figura 9.** Efecto de DXCS 10 mM sobre la expresión proteica de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$ . Cada determinación se realizó en pool de mucosa duodenal de tres pollos para cada una de las condiciones experimentales. Controles y Tratados. Los valores son expresados como las medias  $\pm$  ES. \*  $p < 0,05$  vs Control respectivo.



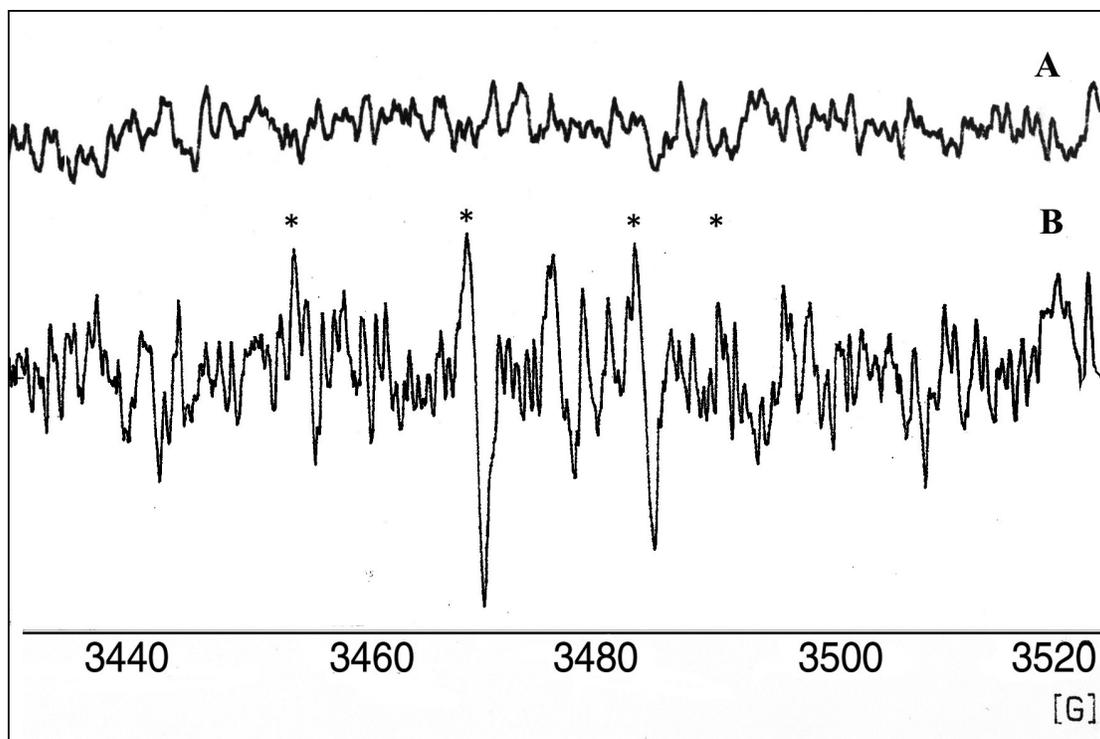
**Figura 10.** Efecto del DXCS 10 mM sobre la inmunolocalización de calbindina  $D_{28k}$  en células del ápice de la vellosidad duodenal después de 30 min. de tratamiento. a: Control; b: Tratado. Barra de magnificación equivale a 20  $\mu\text{m}$ . Flecha: núcleo. Punta de flecha: citoplasma.

## **EFFECTO DEL DXCS SOBRE EL SISTEMA REDOX INTESTINAL**

### **Efecto del DXCS sobre la generación de radicales**

#### **libres hidroxilos**

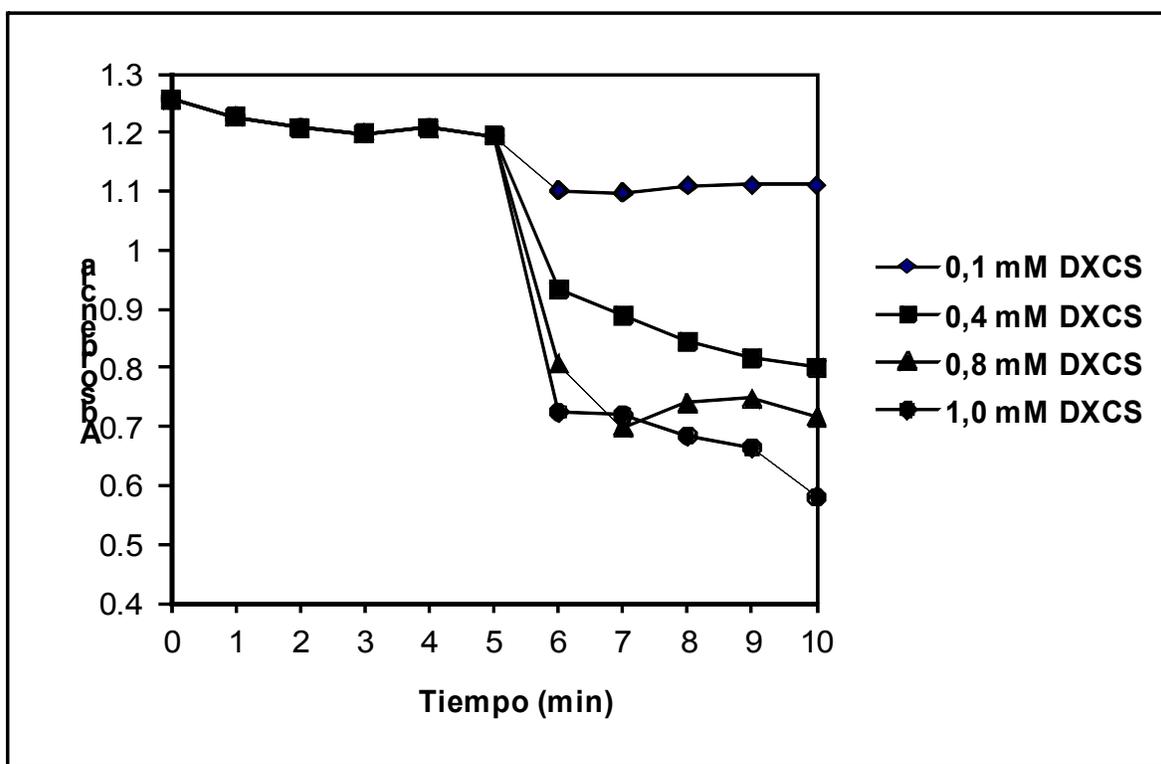
El espectro de resonancia generado por la adición *in vitro* de DXCS 10 mM al medio de incubación de los enterocitos maduros aislados de la vellosidad produjo una señal que fue característica del grupo de los radicales hidroxilos. Esta señal se obtuvo después de 30 min. de la adición de DXCS al medio de incubación (Fig.11).



**Figura 11.** Efecto del DXCS 10 mM sobre la generación de radicales libres hidroxilos. (A) Espectro de resonancia electrónica del *spin* (ESR) de enterocitos maduros ( $1 \times 10^6$  cel), incubados con *buffer* de fosfato pH 7,4 más glucosa 10 mM pH 7,4 conteniendo 5,5-dimetil-1-pirrolina (DMPO) 0,1 M. (B) Espectro ESR de enterocitos maduros ( $1 \times 10^6$  cel) incubados en el mismo *buffer* mas DXCS 10 mM por 30 min. e inmediatamente tratados con DMPO 0,1 M. Las condiciones espectrofotométricas fueron: microonda 20mW; modulación de frecuencia 50 kHz; modulación amplitud 0.5 G; tiempo constante 655,36 ms; se acumularon 10 espectros. \* Representa el patrón característico del grupo de radicales libres hidroxilos. El gráfico representa uno de tres experimentos independientes.

## Efecto del DXCS sobre la integridad de la membrana mitocondrial

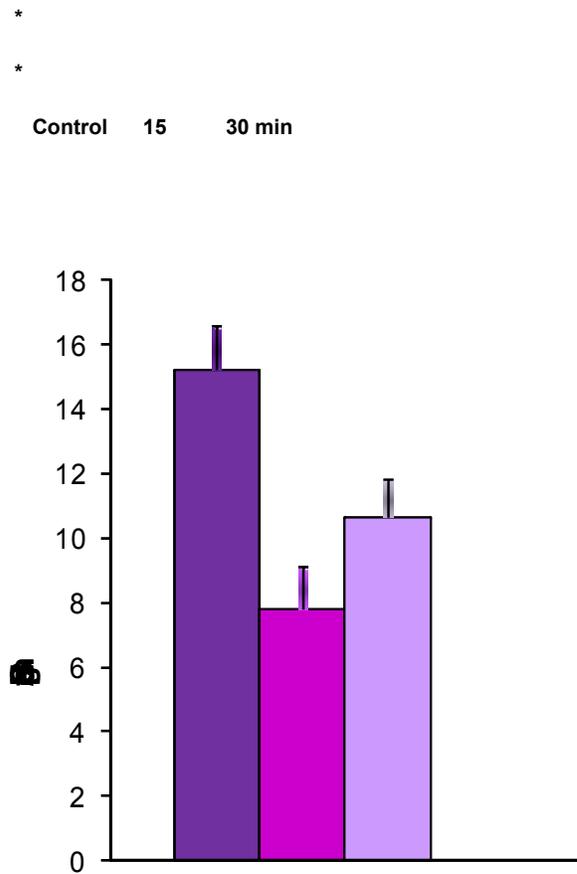
En mitocondrias aisladas de la mucosa duodenal, el DXCS alteró la permeabilidad de la membrana mitocondrial, como puede observarse por la disminución de la densidad óptica de la organela (*swelling*) producida por el agregado de la sal biliar, efecto que fue dependiente de la dosis. (Fig. 12)



**Figura 12.** Efecto del DXCS sobre la densidad óptica (*swelling*) de mitocondrias aisladas de enterocitos de pollo. Los valores de absorbancia basales se midieron durante 5 min. y después de la adición de concentraciones crecientes de DXCS, otros 5 min. más. La flecha indica la adición de DXCS. El gráfico representa uno de tres experimentos independientes.

## Efecto del DXCS sobre el contenido de glutatión

El contenido de glutatión (GSH) total en homogeneizado de mucosa duodenal disminuyó con DXCS 10 mM después de 15 min de tratamiento permaneciendo bajo a los 30 min. (Fig. 13).



**Figura 13.** Efecto del DXCS 10 mM sobre el contenido total de glutatión (GSH) en sobrenadante de mucosa duodenal. Los valores son expresados como las medias  $\pm$  ES de 6 a 10 animales por cada condición experimental. \*  $p < 0,05$  vs Control.

## **Efecto del DXCS sobre las actividades de las enzimas del sistema antioxidante (SOD, GPx y CAT)**

Las enzimas del sistema enzimático antioxidante SOD, CAT y GPx incrementaron sus actividades a los 15 min. de tratamiento con DXCS 10 mM. El aumento en la actividad SOD y GPx se mantuvo por 30 min., mientras que el de CAT se normalizó a los 30 min. (Tabla 1).

**Tabla 1. Efecto del DXCS sobre la actividad de las enzimas del sistema antioxidante en mucosa duodenal**

	<b>Control</b>	<b>15 minutos de tratamiento</b>	<b>30 minutos de tratamiento</b>
<b>SOD (U/mg proteína)</b>	6,92 ± 0,59(11)	11,83 ± 1,05(5)*	10,68 ± 1,13(7)*
<b>GPx (mU/mg proteína)</b>	70,20 ± 9,22(5)	106,01 ± 5,29(3)*	114,70 ± 6,49(3)*
<b>CAT (U/mg proteína)</b>	6,75 ± 0,81(5)	17,20 ± 1,67(5)*	7,20 ± 0,60(3)

--	--	--	--

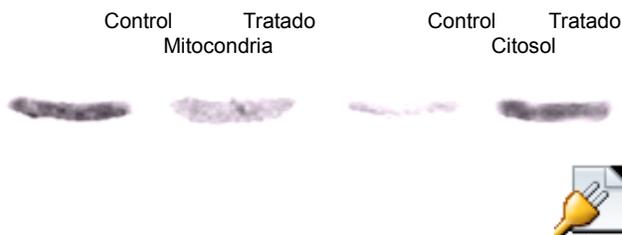
(n) = número de ensayos independientes. \* p < 0,05 vs grupo control.

Superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).

## EFFECTOS DEL DXCS SOBRE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS INTETINALES

### Expresión de citocromo c en fracción mitocondrial y citosólica después del tratamiento con DXCS

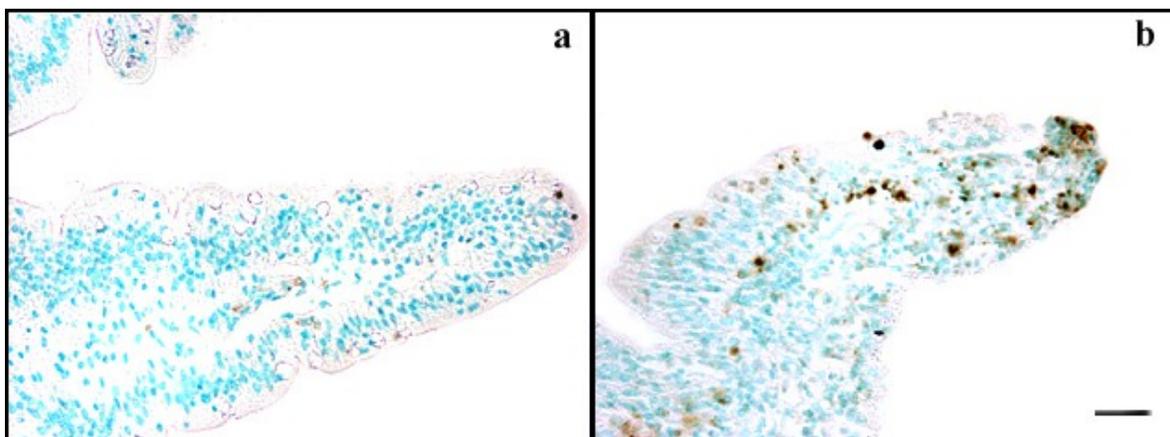
El tratamiento con DXCS 10 mM por 30 min. produjo liberación de citocromo c desde la mitocondria, una expresión de apoptosis por la vía intrínseca, como lo demostró la mayor expresión de citocromo c en el citosol y la menor expresión en la mitocondria después del tratamiento (Fig.14).



**Figura 14.** Expresión de citocromo c en fracción mitocondrial y citosólica de homogeneizado de enterocitos después del tratamiento con DXCS 10 mM (Western blot). Arriba: panel representativo del Western blot. Abajo: análisis densitométrico de las bandas. Los valores son expresados como las medias  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,001$  vs Control respectivo.

### **Estudio de la fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL**

La fragmentación del ADN, uno de los efectos finales de la apoptosis, también incrementó por el tratamiento con DXCS 10 mM, especialmente en enterocitos del ápice (Fig.15). En los enterocitos el aumento de la fragmentación del ADN fue de aproximadamente cuatro veces con respecto a su control a los 15 min. de tratamiento, incrementándose este efecto con el tiempo. Por el contrario, el DXCS no modificó los índices apoptóticos en células del tejido conectivo. (Tabla 2).



**Figura 15.** Fragmentación de ADN por técnica de TUNEL en vellosidades duodenales de pollo: **a**, control; **b**, 30 min de tratamiento con DXCS 10 mM. La barra de magnificación equivale a 20µm.

**Tabla 2. Efecto del DXCS sobre el índice apoptótico en enterocitos duodenales y células del tejido conectivo**

Tipo celular	Tratamiento	15 minutos	30 minutos
Enterocitos	Control	2,61 ± 1,54	2,88 ± 1,08
	DXCS	9,54 ± 1,19 *	15,38 ± 0,62 †
Células de tejido conectivo	Control	7,15 ± 0,85	10,2 ± 1,03
	DXCS	8,14 ± 1,22	8,11 ± 0,71

El índice apoptótico se expresa como las medias  $\pm$  ES del análisis de muestras de tres animales por grupo experimental. Se estudiaron 10 vellosidades por animal. \*  $p < 0,05$  vs Control respectivo, †  $p < 0,001$  vs Control respectivo.

## EFFECTO DE UN ANTIOXIDANTE SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO EN PRESENCIA DE LA SAL BILIAR

La administración combinada del antioxidante quercetina (QT), bloqueó el efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de calcio provocada por el DXCS. QT sola provocó similar respuesta que el grupo control (Fig.16)

Control                      DXCS                      DXCS + QT                      QT

**Figura 16.** Efecto de DXCS 10 mM, QT 50 $\mu$ M y el tratamiento combinado sobre la absorción intestinal de calcio. Los valores son expresados como las medias  $\pm$  ES de 4 pollos para cada condición experimental. \*  $p < 0,001$  vs Control y QT, †  $p < 0,01$  vs DXCS + QT.

Capítulo 4  
**DISCUSIÓN**

Este trabajo claramente demuestra que el DXCS, colocado en el lumen del duodeno de pollo durante corto tiempo y en altas concentraciones, produce inhibición de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ . El efecto es dependiente de la concentración de la sal biliar. Es conocido que el contenido de DXCS en el intestino varía de acuerdo con la dieta. Se ha demostrado que la concentración de DXCS fue significativamente más baja en el agua fecal de pacientes vegetarianos que en pacientes omnívoros (112). Por otro lado, el aumento en la ingesta de grasa produce incremento de la secreción de AB primarios en el duodeno, lo cual resulta en un elevado nivel de AB secundarios, entre ellos el DXCS, por la acción metabólica de la flora intestinal (66). Las concentraciones de DXCS usadas en nuestro estudio se encuentran en el rango de concentraciones de DXCS conjugado con taurina y glicina presentes en la vesícula biliar de individuos sanos (13), las cuales también se corresponden a las halladas en la fracción acuosa de las heces de pacientes con resección del íleon (59). Las concentraciones de los AB en el lumen intestinal son por lo general altas, en el rango milimolar. Esto se relaciona con la concentración micelar crítica (6-10 mM), es decir, la concentración correspondiente a la formación espontánea de micelas (82).

En cuanto a la morfología del tejido intestinal, no se observaron cambios histológicos detectables por microscopía de luz en los tiempos elegidos para el estudio, 15 y 30 min. post inyección. En cambio, se observó alteración de la morfología tanto en los controles como en los tratados con DXCS a los 60 min.

Nuestro modelo experimental de doble ligadura produjo isquemia del intestino a partir de 60 min., observándose lesiones como la contracción de las vellosidades, presencia de zonas con edema y algunas zonas con desprendimiento del epitelio. Independientemente de la naturaleza del evento isquémico, lesiones similares fueron publicadas por otros autores (18), quienes reportaron lesiones en el intestino tales como el desprendimiento del epitelio desde la punta de la vellosidad hacia la base de la vellosidad y, finalmente, en la cripta en función del grado de la isquemia (completo o de bajo flujo) y la duración de la isquemia.

El efecto inhibitorio del DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  afecta la vía transcelular de la absorción intestinal del catión como lo demuestra la disminución en la expresión de algunas proteínas involucradas en el movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  a través del enterocito hacia la lámina propia como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (NCX1), la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa (PMCA<sub>1b</sub>) y la calbindina D<sub>28k</sub> (CB<sub>28k</sub>). El DXCS podría disminuir la transcripción del gen de la PMCA<sub>1b</sub> como se demuestra por los niveles reducidos del ARNm de *pmca<sub>1b</sub>*, aunque un aumento en la degradación del transcrito no puede descartarse. Por el contrario, el tratamiento con DXCS no afecta la expresión génica de *ncx1* y *cb*. La disminución en la expresión de las proteínas NCX1, PMCA<sub>1b</sub> y CB<sub>28k</sub> después del tratamiento con DXCS podría indicar que la sal biliar disminuye la traducción de estas proteínas. Sin embargo, no se puede desechar un aumento en la degradación proteica como consecuencia del estrés oxidativo.

Otra proteína afectada por el DXCS es la fosfatasa alcalina intestinal (FAI). El tratamiento con la sal biliar a los 30 min. disminuye significativamente la actividad

de FAI. La FAI es una fosfomonoesterasa anclada en la bicapa lipídica del borde en cepillo del enterocito. El sitio catalítico de la enzima está orientado hacia el saco luminal del intestino, es probable que el DXCS interaccione con el sitio activo e inhiba la actividad enzimática. La ubicación de la FAI en el enterocito sugiere cierta participación en la absorción de nutrientes, pero su función aún no ha sido definida. La FAI es una enzima presumiblemente relacionada con la entrada del  $\text{Ca}^{+2}$  al enterocito (64), posiblemente la disminución de la actividad de esta enzima contribuya a disminuir la absorción del catión. Se ha demostrado cierto paralelismo con la expresión de otras proteínas involucradas en la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  y el efecto regulatorio de la vitamina D (24). Se conoce que la actividad de FAI en mamíferos puede ser modificada por sustancias que se unen a ciertos residuos de aminoácidos próximos al sitio activo (77). FAI también ejerce una función importante en la homeostasis intestinal y su actividad puede ser aumentada a través de la dieta (72).

Los AB son reconocidos como moléculas de señales que participan en diferentes procesos metabólicos. Ellos regulan su propia síntesis y degradación y también modulan el metabolismo de los triglicéridos, del colesterol, de la glucosa y el metabolismo energético (74). Es probable que el efecto inhibitorio del DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  sea producto de la interacción de la sal biliar con algún tipo de receptor. Se han propuesto varios receptores para los AB, como receptores nucleares, el receptor farnesoide X (FXR), el receptor de vitamina D (RVD), el receptor hepático homólogo-1 (LRH-1) y el receptor de membrana acoplado a proteína G (TGR5), entre otros (74, 60).

El presente trabajo fue realizado en duodeno, sitio donde la velocidad de absorción del  $\text{Ca}^{+2}$  es mayor (22) y el DXCS se encuentra en mayor concentración. Buts y col. (26) demostraron en ratas colestásicas que la administración oral de AB tauroconjugados (50 mmoles, tres veces por día) disminuyó la capacidad de absorción de  $\text{Ca}^{+2}$  en el duodeno y yeyuno, pero no afectó la absorción del catión en el íleon y que el efecto fue proporcional a la concentración de los AB en el medio. Los autores consideraron que el efecto inhibitorio podría deberse a la formación de complejos de los AB con el  $\text{Ca}^{+2}$  libre y a alteraciones en la composición de la membrana del borde en cepillo. En nuestro modelo experimental el DXCS fue removido del duodeno, el cual fue lavado antes de colocar el  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  para la medición de la absorción del catión. Es por ello que, en este caso, la sal biliar no formaría complejos con el  $\text{Ca}^{+2}$  libre. Por el contrario, estudios de Webling y Holdsworth en pollos (122, 123) demostraron que los AB y los detergentes aumentan la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  en el íleon independientemente del estado de vitamina D. Está bien establecido que los AB, además de su función principal en la absorción de los lípidos, participan en otros procesos biológicos tales como el transporte iónico intestinal, la inflamación intestinal y la carcinogénesis. En todos estos procesos los AB no producen la misma respuesta biológica, es decir sus efectos varían principalmente de acuerdo con su estructura química y con el grado de conjugación que presenta la sal biliar (82).

Como se esperaba, el efecto inhibitorio del DXCS sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  se asocia a estrés oxidativo como lo revela la generación de

ROS y la alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Además, la presencia de un antioxidante como quercetina (QT) en el medio de incubación, restaura la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  a los valores de los controles, lo cual confirma que el efecto inhibitorio del DXCS es mediado por estrés oxidativo. QT es un flavonoide polifenólico presente en grandes cantidades en la dieta humana (té negro y verde, manzana, cebolla, especialmente cebollas rojas, uvas rojas, cítricos, tomate, brócoli, frambuesa, arándano, etc) y se destaca por su elevada actividad antioxidante (2).

Está bien demostrado que los AB hidrofóbicos como el DXCS estimulan la generación de ROS en hepatocitos en cultivo y en mitocondrias aisladas de hepatocitos (104). Además, producen disminución del potencial de membrana en células de colon en cultivo y la formación de megamitocondrias en diferentes líneas celulares (118). Parte de los efectos adversos de los AB sobre la mitocondria podrían relacionarse a alteración de la composición de la membrana mitocondrial y modificación del contenido de fosfolípidos de la membrana; esto modificaría la fluidez de la membrana, el potencial de membrana, los niveles de ATP, la producción de ROS y se aumentaría la propensión a desencadenar apoptosis (9).

La acumulación de AB en tejidos como el hígado durante la colestasis, afecta directamente las actividades de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. El DXCS inhibe los complejos I y III en mitocondrias aisladas de hepatocitos (68), disminuyendo la síntesis de ATP y la relación entre síntesis de ATP y consumo de oxígeno (66). La etapa final de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$

es la salida del catión por la membrana basolateral (MBL) del enterocito, este proceso requiere de ATP debido a que mueve  $\text{Ca}^{+2}$  en contra del gradiente desde el citoplasma del enterocito al intersticio (45). Como mencionamos anteriormente el DXCS altera la función de las mitocondrias, cuyo principal papel es el suministro de la mayor cantidad de la energía necesaria para la actividad celular en forma de ATP, lo cual en parte podría ser la causa de la menor capacidad de transporte del catión en la célula epitelial intestinal.

Además, el estrés oxidativo desencadenado por el DXCS podría llevar a la apoptosis, como se demuestra por la fragmentación del ADN y la liberación del citocromo c desde la mitocondria. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico caracterizado por modificaciones morfológicas y bioquímicas. Está estrictamente regulada mediante la activación secuencial de vías de transducción de señales y la perturbación de la función de la membrana mitocondrial causando la liberación de proteínas intramitocondriales (proapoptogénicas) dentro del citoplasma que, finalmente, lleva a la degradación de la célula (126). La fragmentación del ADN podría ser el resultado de la activación de caspasas producida por el citocromo c liberado desde la mitocondria. El citocromo c es una proteína de 12,5 kDa localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria y es un componente de la cadena respiratoria. Cuando el citocromo c es liberado hacia el citoplasma, se une al factor de activación de proteasa apoptótica 1 (apaf1) para formar el apoptosoma, el cual se une y activa a la caspasa iniciadora (99) con consiguiente activación proteolítica de las caspasas ejecutoras 3,6 y 7. Al activarse estas caspasas, se producen

cambios morfológicos en la célula incluyendo el núcleo, llevando a la fragmentación del ADN (98).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que drogas que disminuyen el glutatión (GSH) causan estrés oxidativo en duodeno de pollo y producen inhibición de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  (109, 78, 79, 80). El DXCS produjo depleción de los niveles de GSH en mucosa duodenal contribuyendo así a aumentar el estrés oxidativo. El GSH es el tripéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, el cual está distribuido en todos los tejidos. La concentración de GSH en el enterocito debe mantenerse a fin de lograr una adecuada absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  (109). Existe una forma reducida (GSH) y otra oxidada (GSSG) (65), la forma reducida es la predominante. El GSSG constituye menos del 1% del GSH total (3). En las células eucariotas, el 90% del GSH está en el citoplasma, el resto se distribuye entre la mitocondria, el núcleo y el retículo endoplásmico (103). La principal función del GSH está vinculada con su poder reductor, el cual contribuye a mantener en estado reducido los grupos sulfhidrilos de las proteínas y el equilibrio redox intracelular. Yang y col. (125) han observado también disminución en los niveles de GSH en hepatocitos de pacientes con colestasis crónica, efecto principalmente atribuido a la deficiencia nutricional y a estrés oxidativo. Otros grupos mostraron caída en los niveles de GSH, ya sea en hígados de animales sometidos a colestasis experimental o hepatocitos tratados con AB tóxicos (54, 102, 41, 39, 97). Portincasa y col. (95) han demostrado en mucosa de colon de rata que el taurodeoxicolato 8 mM disminuye el GSH, aumenta el GSSG y los grupos carbonilos de las proteínas, todas expresiones de estrés oxidativo.

Como mecanismo compensatorio las enzimas del sistema antioxidante superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), incrementan sus actividades después del tratamiento con la sal biliar, quizás para proteger a la mucosa duodenal del estrés oxidativo provocado. Se ha observado previamente que el DXCS 5 mM colocado en el colon de ratas aumenta la actividad de ornitina descarboxilasa y la incorporación de timidina H<sup>3</sup> al ADN, respuesta anulada por SOD (37). En nuestro trabajo SOD incrementa su actividad en respuesta al tratamiento con DXCS. Los aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) son eliminados en una reacción catalizada por SOD, enzima muy activa y distribuida en todos los tejidos. En realidad, SOD constituye la primera línea de defensa para atenuar los efectos oxidantes del O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Como producto de esta reacción aumentaría la formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que también es tóxico y debería ser eliminado. Las actividades de CAT y GPx aumentarían para reducir la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado. La GPx cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en reacciones en las que el GSH participa como donante de hidrógeno, es decir su actividad depende de la disponibilidad de GSH en la célula, mientras que la CAT cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. Es destacable que en las condiciones de nuestro estudio la actividad de GPx permanece aumentada por más tiempo y, en cambio, la actividad de CAT se normaliza a los 30 min. de tratamiento con DXCS. El remanente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin destruirse podría inducir la cascada de eventos apoptóticos, los cuales continúan hasta la fragmentación del ADN. Por lo tanto el DXCS produciría alteraciones en el balance de los procesos oxidativos y reductivos del enterocito con consecuencias deletéreas sobre la absorción intestinal de Ca<sup>+2</sup>.

La mala absorción del  $\text{Ca}^{+2}$  ha sido considerada un factor importante en la enfermedad ósea producida en pacientes con cirrosis biliar primaria (CBP) (113). El efecto inhibitorio del DXCS sobre la absorción intestinal del catión podría explicar, al menos en parte, el deterioro en la salud ósea de estos pacientes. Xiao y col. (124) demostraron que en ratones alimentados con dietas ricas en grasas se produjo disminución marcada en la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  y en la densidad mineral ósea (DMO) de cuerpo entero, acompañado por desequilibrio redox en el duodeno y disminución en la expresión de algunos genes involucrados en la vía transcelular del catión. Como mencionamos anteriormente las dietas ricas en grasas podrían aumentar la producción de AB y, por consiguiente, la de DXCS. Por lo tanto, todas las condiciones que transcurren con aumento en la producción de DXCS podrían disminuir la absorción de  $\text{Ca}^{+2}$ , afectando no solo la homeostasis del catión sino también la salud del hueso.

Sorprendentemente, AB hidrofílicos como el ursodeoxicólico (UDCA) y su forma conjugada, el ácido tauroursodeoxicólico, ejercen importantes propiedades citoprotectoras. Son potentes inhibidores de las vías clásicas de la apoptosis, aunque aún permanece en estudio su mecanismo de acción. Constituyen además, la terapia de elección para los síndromes colestásicos más severos (5).

Está bien demostrado que la enfermedad ósea es una complicación frecuente en la CBP, pero su patogenia es difícil de comprender. Verma y col. (113) encontraron que pacientes con CBP presentaban baja DMO de cuello femoral y columna vertebral, reducción de la absorción de  $\text{Ca}^{+2}$  y aumento de osteocalcina en plasma. El tratamiento con UDCA corrigió parcialmente la mala absorción del

cación. Por lo tanto es muy probable que el DXCS en presencia de UDCA disminuya o anule su efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los datos presentados en este trabajo claramente indican que el DXCS en altas concentraciones, pero dentro del rango fisiológico, inhibe la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la disminución de la expresión de las principales proteínas involucradas en la vía transcelular de la absorción del catión, como consecuencia del estrés oxidativo y la apoptosis mediada por la mitocondria (Figura 17). Estudios a largo plazo son necesarios para conocer cómo la inhibición en la absorción del  $\text{Ca}^{2+}$  podría ocasionar cambios desfavorables para la salud del hueso.

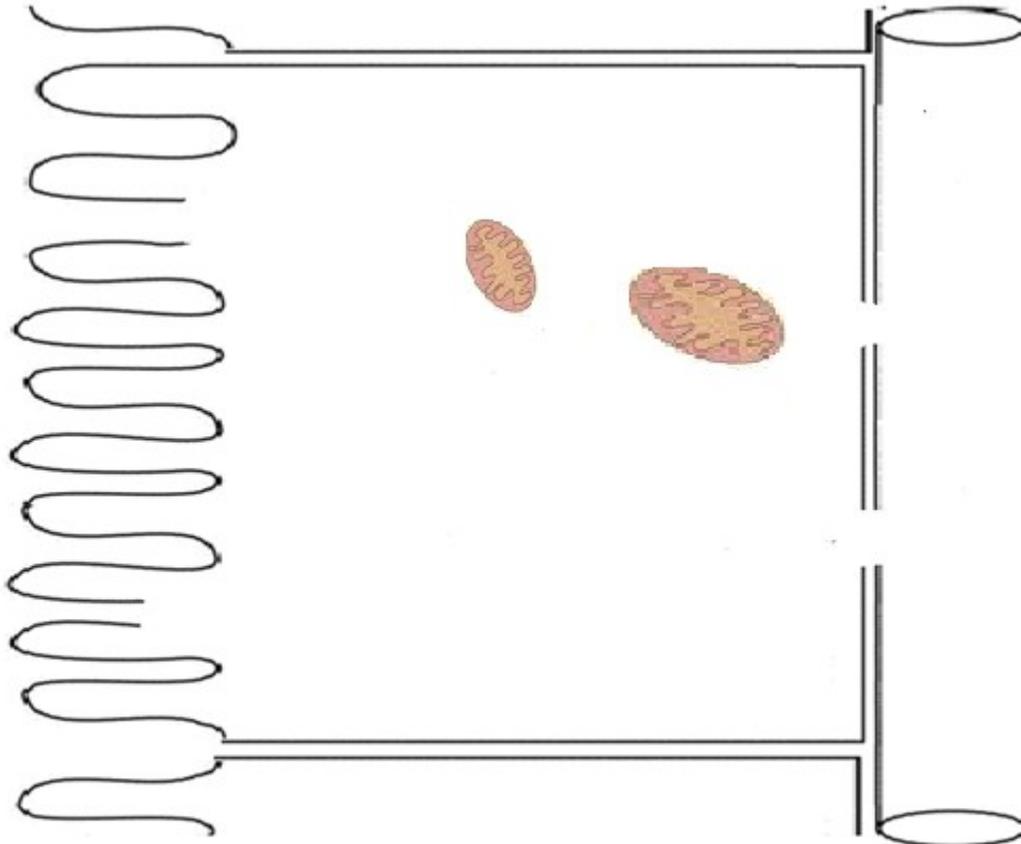


## DXCS

¿?

LUMEN

SANGRE



Ca<sup>2+</sup>

Ca<sup>2+</sup>-ATPasa

Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

*swelling*

activación de caspasas

citocromo c

**APOPTOSIS**

¿?

¿?

-----

**fragmentación nuclear**

**apoptosoma**

**ROS**

**TRPV5**

**TRPV6**

**Figura 17.** Mecanismo hipotético del DXCS sobre la absorción intestinal de calcio y variables asociadas. El DXCS en altas concentraciones, pero dentro del rango fisiológico, inhibe la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la disminución de la expresión de las principales proteínas involucradas en la vía transcelular de la absorción del catión ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$ , FAI?), como consecuencia del estrés oxidativo (GSH, ROS) y la apoptosis mediada por la mitocondria (liberación del citocromo c y fragmentación del ADN). Las enzimas del sistema antioxidante aumentan su actividad (SOD, CAT, GPx), pero no logran neutralizar el efecto oxidante provocado por el DXCS y el intestino altera sus propiedades absorbivas (disminución de la absorción de  $\text{Ca}^{+2}$ ).

# CONCLUSIONES

- El presente estudio indica que el DXCS en altas concentraciones pero dentro del rango fisiológico, inhibe la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$ , efecto dependiente de la concentración de la sal biliar.
- La FAI es una enzima presumiblemente relacionada con la entrada del  $\text{Ca}^{+2}$  al enterocito, posiblemente la disminución de su actividad por el tratamiento con DXCS contribuya a disminuir la absorción del catión.

- El efecto inhibitorio del DXCS sobre la absorción intestinal de calcio afecta la vía transcelular de absorción del catión a juzgar por la disminución en la expresión de  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  y calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$ , proteínas involucradas en el movimiento del  $\text{Ca}^{+2}$  hacia la lámina propia. Esto podría deberse a una disminución en la traducción o a un aumento en la degradación proteica como consecuencia del estrés oxidativo producido por el DXCS.
- El DXCS produce reducción de la expresión del gen de la *pmca<sub>1b</sub>* efecto que podría deberse a la disminución de la transcripción aunque un aumento en la degradación del transcripto no puede excluirse. Los ARNm de otros genes que participan en el movimiento transcelular del calcio parecen no afectarse.
- El DXCS disminuye el contenido de GSH, contribuyendo así al desencadenamiento de estrés oxidativo.
- El DXCS altera la función mitocondrial mediante inducción de estrés oxidativo como se pone en evidencia por la generación de ROS y la alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial.
- La presencia del antioxidante QT previene el efecto inhibitorio de la sal biliar sobre la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que prueba que el efecto del DXCS es mediado por estrés oxidativo.
- Para proteger a la mucosa intestinal del estrés oxidativo, el sistema antioxidante incrementa su actividad, sin embargo no alcanza contrarrestar

el daño producido por el DXCS, el cual lleva al epitelio intestinal a la apoptosis.

- La acción conjunta del estrés oxidativo y la apoptosis disminuiría el número de células epiteliales intestinales con capacidad absorbente plena, llevando al deterioro de la incorporación de  $\text{Ca}^{+2}$  al organismo.

## Capítulo 5

# BIBLIOGRAFÍA

1. Aebi H. 1974. Catalase. En: Bergmeyer HU (Ed.). Methods of enzymatic analysis. New York. Academic Press. Pp: 673-684.
2. Aherne SA, O'Brien NM. 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. Free Radic. Biol. Med. 2000. 29: 507-514.

3. Akerboom TP, Bilzer M, Sies H. 1982. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 257: 4248-4252.
4. Alisio A, Cañas F, de Bronia DH, Pereira R, Tolosa de Talamoni N. 1997. Effect of vitamin D deficiency on lipid composition and calcium transport in basolateral membrane vesicles from chick intestine. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42: 339-344.
5. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2009. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J. Lipid. Res.* 50: 1721-1734.
6. Anderson ME. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in: biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-555.
7. Anderson RG. 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 10909-10913.
8. Araki Y, Katoh T, Ogawa A, Bamba S, Andoh A, Koyama S, Fujiyama Y, Bamba T. 2005. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 769-780.
9. Arduini A, Serviddio G, Tormos AM, Monsalve M, Sastre J. 2012. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases. *Front. Biosci.* 4: 2233- 2252.
10. Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. 1986. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses.* 19: 57-69.
11. Beauchamp CQ, Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta.* 317: 50-64.

12. Bernstein C, Holubec H, Bhattacharyya AK, Nguyen H, Payne CM, Zaitlin B, Bernstein H. 2011. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch. Toxicol.* 85: 863-871.
13. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. 2005. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat. Res.* 589: 47-65.
14. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 11-21.
15. Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, Suzuki Y, Crescenzi A, Kos CH, Zhuang L, Freeman MR, Gouveia CH, Wu J, Luo H, Mauro T, Brown EM, Hediger MA. 2007. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the *Trpv6* calcium channel gene. *J. Bone Miner. Res.* 22: 274-285.
16. Billington D, Evans CE, Godfrey PP, Coleman R. 1980. Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 188: 321-327.
17. Blaustein MP, Lederer WJ. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79: 763-854.
18. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol. Rev.* 87: 545-564.
19. Bronner F, Lipton J, Pansu D, Buckley M, Singh R, Miller A. 1982. Molecular and transport effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rat duodenum. *Fed. Proc.* 41: 61-65.
20. Bronner F, Pansu D, Stein WD. 1986. Analysis of calcium transport in rat intestine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 208: 227-234.

21. Bronner F, Pansu D. 1999. Nutritional aspects of calcium absorption. *J. Nutr.* 129: 9-12.
22. Bronner F. 1998. Calcium absorption – a paradigm for mineral absorption. *J. Nutr.* 128: 917-920.
23. Bronner F. 2003. Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 300: 47-52.
24. Brun LR, Brance ML, Rigalli A. 2012. Luminal calcium concentration controls intestinal calcium absorption by modification of intestinal alkaline phosphatase activity. *Br. J. Nutr.* 108: 229-233.
25. Burnat G, Majka J, Konturek PC. 2010. Bile acids are multifunctional modulators of the Barrett's carcinogenesis. *J. Physiol. Pharmacol.* 61: 185-192.
26. Buts JP, De Keyser N, Collette E, Bonsignore M, Lambotte L, Desjeux JF, Sokal EM. 1996. Intestinal transport of calcium in rat biliary cirrhosis. *Pediatr. Res.* 40: 533-541.
27. Cashman KD. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br. J. Nutr.* 87: 169-177.
28. Cashman KD. 2007. Diet, nutrition, and bone health. *J. Nutr.* 137: 2507S-2512S.
29. Centeno VA, Díaz de Barboza GE, Marchionatti AM, Alisio AE, Dallorso ME, Nasif R, Tolosa de Talamoni NG. 2004. Dietary calcium deficiency increases Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca<sup>2+</sup> extrusion mechanisms in chick enterocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 139: 133-141

30. Chamulitrat W. 1999. Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 411-421.
31. Cheng WH, Valentine BA, Lei XG. 1999. High levels of dietary vitamin E do not replace cellular glutathione peroxidase in protecting mice from acute oxidative stress. *J. Nutr.* 129: 1951-1957.
32. Christakos S, Gill R, Lee S, Li H. 1992. Molecular aspects of the calbindins. *J. Nutr.* 122: 678-682.
33. Clapham DE. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426: 517-524.
34. Clapham DE. 1995. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature.* 75: 634-635.
35. Cohen DE. 2003. Pathogenesis of gallstones. En: Zakim D, Boyer TD (ed). *Hepatology: A Textbook of Liver Disease.* Saunders, Philadelphia. Pp. 1713-1743.
36. Cramer CF, Copp DH. 1959. Progress and rate of absorption of radiostrontium through intestinal tracts of rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102: 514-517.
37. Craven PA, Pfanstiel J, Saito R, DeRubertis FR. 1986. Relationship between loss of rat colonic surface epithelium induced by deoxycholate and initiation of the subsequent proliferative response. *Cancer Res.* 46: 5754-5759.
38. De Luca F. 1997. Historical Overview. En: Feldman D, Glorieux F and Pike J. (ed). *Vitamin D.* Academic Press, San Diego. Pp 3-11.

39. Demirbilek S, Tas E, Gurunluoglu K, Akin M, Aksoy RT, Emre MH, Aydin NE, Ay S, Ozatay N. 2007. Fluvastatin reduced liver injury in rat model of extrahepatic cholestasis. *Pediatr. Surg. Int.* 23: 155-162.
40. Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ. 2011. Molecular basis of epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport: insights from the TRP channel family. *J. Physiol.* 589: 1535-1542.
41. Ebrahimkhani MR, Sadeghipour H, Dehghani M, Kiani S, Payabvash S, Riazi K, Honar H, Pasalar P, Mirazi N, Amanlou M, Farsam H, Dehpour AR. 2005. Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis. *Life Sci.* 76: 2497-2512.
42. Esteller A. 2008. Physiology of bile secretion. *World J. Gastroenterol.* 14: 5641-5649.
43. Feher JJ, Fullmer CS, Wasserman RH. 1992. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am. J. Physiol.* 262: 517- 526.
44. Fleet JC, Schoch RD. 2010. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 47: 181-195.
45. Fleet JC. 2003. Molecular regulation of calcium and bone metabolism through the vitamin D receptor. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 6: 336-337.
46. Flynn A. 2003. The role of dietary calcium in bone health. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 851-858.
47. Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, Miana-Mena J, Berzosa C, Piedrafita E, Cebrián I, Reiter RJ, García JJ. 2009. Lipid and protein oxidation in hepatic

homogenates and cell membranes exposed to bile acids. *Free Radic. Res.* 43: 1080-1089.

48. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. 2008. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes. *Mol. Biol. Cell.* 19: 1912-1921.
49. Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol. Biotechnol.* 8: 61-77.
50. Ghijssen WE, De Jong MD, Van Os CH. 1983. Kinetic properties of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* 730: 85-94.
51. Goldman A, Chen H, Khan MR, Roesly H, Hill KA, Shahidullah M, Mandal A, Delamere NA, Dvorak K. 2011. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger controls deoxycholic acid-induced apoptosis by a H<sup>+</sup>-activated, Na<sup>+</sup>-dependent ionic shift in esophageal cells. *PLoS One.* 6: e23835.
52. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-756.
53. Guiraldes E, Lamabadusuriya SP, Oyesiku JE, Whitfield TE, Harries JT. 1975. A comparative study on the effects of different bile salts on mucosal ATPase and transport in the rat jejunum in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 389: 495-505.

54. Gumprich E, Devereaux MW, Dahl RH, Sokol RJ. 2000. Glutathione status of isolated rat hepatocytes affects bile acid-induced cellular necrosis but not apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164: 102-111.
55. Ha YH, Park DG. 2010. Effects of DCA on Cell Cycle Proteins in Colonocytes. *J. Korean Soc. Coloproctol.* 26: 254-259.
56. Hill MJ. 1990. Bile flow and colon cancer. *Mutat. Res.* 238: 313-320.
57. Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. 1999. Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia. *J. Biol. Chem.* 274: 8375-8378.
58. Hoenderop JG, Bindels RJ. 2008. Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology (Bethesda).* 23: 32-40.
59. Hofmann AF, Hoffman N. 1974. Measurement of bile and acid kinetics by isotope dilution in man. *Gastroenterology.* 67: 314-323.
60. Honjo Y, Sasaki S, Kobayashi Y, Misawa H, Nakamura H. 2006. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its receptor inhibit the chenodeoxycholic acid-dependent transactivation by farnesoid X receptor. *J. Endocrinol.* 188: 635-643.
61. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. 2006. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J.* 25: 1419-1425.
62. Ignacio Barrasa J, Olmo N, Pérez-Ramos P, Santiago-Gómez A, Lecona E, Turnay J, Antonia Lizarbe M. 2011. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis.* 16:1054-1067.

63. Jean-Louis S, Akare S, Ali MA, Mash EA Jr, Meuillet E, Martinez JD. 2006. Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations; J. Biol. Chem. 281:14948-14960.
64. Jeng YJ, Watson CS, Thomas ML. 1994. Identification of vitamin D-stimulated alkaline phosphatase in IEC-6 cells, a rat small intestine crypt cell line. Exp. Cell. Res. 212: 338-343.
65. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. 1985. The regulation of hepatic glutathione. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25: 715-744.
66. Kawano A, Ishikawa H, Kamano T, Kanoh M, Sakamoto K, Nakamura T, Otani T, Sakai T, Kono K. 2010. Significance of Fecal Deoxycholic Acid Concentration for colorectal tumor enlargement. Asian Pac. J. Cancer Prev. 11: 1541-1546.
67. Kenneth JL and Schmittgen TP. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. Methods. 25: 402-408.
68. Koyama K, Ito K, Ouchi K, Sato T. 1980. Mitochondrial function of rat liver in biliary obstruction. Tohoku. J. Exp. Med. 131: 59-69.
69. Krähenbühl S, Fischer S, Talos C, Reichen J. 1994. Ursodeoxycholate protects oxidative mitochondrial metabolism from bile acid toxicity: dose-response study in isolated rat liver mitochondria. Hepatology. 20:1595-1601.
70. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. 2004. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. Gastroenterology. 126: 322- 342.
71. Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

72. Lallès JP. 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* 68: 323-332.
73. Lederer WJ, He S, Luo S, duBell W, Kofuji P, Kieval R, Neubauer CF, Ruknudin A, Cheng H, Cannell MB, Rogers TB, Schulze DH. 1996. The molecular biology of the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger and its functional roles in heart, smooth muscle cells, neurons, glia, lymphocytes, and nonexcitable cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 779: 7-17.
74. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89: 147-191.
75. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. 2006. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116: 1102-1109.
76. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K. 2002. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298: 714-719.
77. Manes T, Hoylaerts MF, Müller R, Lottspeich F, Hölke W, Millán JL. 1998. Genetic complexity, structure, and characterization of highly active bovine intestinal alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 273: 23353-23360.
78. Marchionatti A, Alisio A, Díaz de Barboza G, Baudino V, Tolosa de Talamoni N. 2001. DL-Buthionine-S,R-sulfoximine affects intestinal alkaline phosphatase activity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 129: 85-91.

79. Marchionatti AM, Díaz de Barboza GE, Centeno VA, Alisio AE, Tolosa de Talamoni NG. 2003. Effects of a single dose of menadione on the intestinal calcium absorption and associated variables. *J. Nutr. Biochem.* 14: 466-472.
80. Marchionatti AM, Perez AV, Diaz de Barboza GE, Pereira BM, Tolosa de Talamoni NG. 2008. Mitochondrial dysfunction is responsible for the intestinal calcium absorption inhibition induced by menadione. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780: 101-107.
81. Marcus CS, Lengemann FW. 1962. Absorption of Ca<sup>45</sup> and Sr<sup>85</sup> from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat. *J. Nutr.* 77: 155-160.
82. Martinez-Augustin O, Sanchez de Medina F. 2008. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* 14: 5630-5640.
83. Mauricio AC, Slawik M, Heitzmann D, von Hahn T, Warth R, Bleich M, Greger R. 2000. Deoxycholic acid (DOC) affects the transport properties of distal colon. *Pflugers Arch.* 439: 532-540.
84. Miyaki A, Yang P, Tai HH, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. 2009. Bile acids inhibit NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase transcription in colonocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297: 559-566.
85. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* 15: 804-816.
86. Nathanson MH, Boyer JL. 1991. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology.* 14: 551-566.
87. Nilius B. 2007. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 162: 244-253.

88. Oumi M, Yamamoto T. 2000. A scanning electron microscope study on the effects of different bile salts on the epithelial lining of jejunal mucosa. *Med. Electron Microsc.* 33: 11-15.
89. Pansu D, Bellaton C, Roche C, Bronner F. 1988. Theophylline inhibits active Ca transport in rat intestine by inhibiting Ca binding by CaBP. *Prog. Clin. Biol. Res.* 252: 115-120.
90. Park JY, Park BK, Ko JS, Bang S, Song SY, Chung JB. 2006. Bile acid analysis in biliary tract cancer. *Yonsei Med. J.* 47: 817-825.
91. Payne CM, Crowley-Weber CL, Dvorak K, Bernstein C, Bernstein H, Holubec H, Crowley C, Garewal H. 2005. Mitochondrial perturbation attenuates bile acid-induced cytotoxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 21: 215-231.
92. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* 274: 22730-22746.
93. Pérez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. 2008. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion.* 77: 22-34.
94. Perwaiz S, Tuchweber B, Mignault D, Gilat T, Yousef IM. 2001. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Lipid. Res.* 42: 114-119.
95. Portincasa P, Grattagliano I, Petruzzelli M, Moschetta A, Debellis L, Palasciano G. 2008. Taurodeoxycholate-induced intestinal injury is modulated by oxidative stress-dependent pre-conditioning like mechanisms. *Toxicol. Lett.* 182: 36-41.

96. Reddy BS. 1980. Dietary fibre and colon cancer: epidemiologic and experimental evidence. *Can. Med. Assoc. J.* 123: 850-856.
97. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. 2007. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappaB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770: 989-996.
98. Riedl SJ, Salvesen GS. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 405-413.
99. Ripple MO, Abajian M, Springett R. 2010. Cytochrome c is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis.* 15: 563-573.
100. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. 1998. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol. Med.* 4: 165-178.
101. Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fucceilli R, Pelli MA, Morozzi G. 2008. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur. J. Nutr.* 47: 301-309.
102. Serviddio G, Pereda J, Pallardó FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vendemiale G, Poli G, Viña J, Sastre J. 2004. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology.* 39: 711-720.

103. Shelly C. Lu, M.D. Regulation of glutathione synthesis. 2009. *Mol. Aspects Med.* 2009. 30: 42-59.
104. Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM Jr. 1995. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology.* 109: 1249-1256.
105. Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprich E, Elkins N, Everson G. 2001. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr. Res.* 49: 519-531.
106. Song Y, Fleet JC. 2007. Intestinal resistance to 1,25 dihydroxyvitamin D in mice heterozygous for the vitamin D receptor knockout allele. *Endocrinology.* 148: 1396-1402.
107. Thijs W.H. Pols, Lilia G. Noriega, Mitsunori Nomura, Johan Auwerx, Kristina Schoonjans. 2011. The Bile Acid Membrane Receptor TGR5: A Valuable Metabolic Target. *Dig. Dis.* 29: 37-44.
108. Tolosa de Talamoni NG, Pereira RD, Hauen de Bronia D, Moreno J, Cañas FM. 1985. Phospholipids and sialic acid changes produced by vitamin D3 on intestinal mitochondria. *Metabolism.* 34: 1007-1011.
109. Tolosa de Talamoni N, Marchionatti A, Baudino V, Alisio A. 1996. Glutathione plays a role in the chick intestinal calcium absorption. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 115: 127-132.
110. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

111. Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. 2001. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:13324-1339.
112. van Faassen A, Hazen MJ, van den Brandt PA, van den Bogaard AE, Hermus RJ, Janknegt RA. 1993. Bile acids and pH values in total feces and in fecal water from habitually omnivorous and vegetarian subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 917-922.
113. Verma A, Maxwell JD, Ang L, Davis T, Hodges S, Northfield TC, Zaidi M, Pazianas M. 2002. Ursodeoxycholic acid enhances fractional calcium absorption in primary biliary cirrhosis. *Osteoporos. Int.* 13: 677-682.
114. Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bödding M, Droogmans G, Nilius B. 2002. Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J. Biol. Chem.* 277: 33704-33710.
115. Walter K, Schutt C. 1974. Acid and alkaline phosphatase in serum (two point method). En: Bermeyer HU (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. New York. Academic Press. Pp: 856-860.
116. Walters JR, Weiser MM. 1987. Calcium transport by rat duodenal villus and crypt basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 252: G170 - G177.
117. Walters JR, Balesaria S, Chavele KM, Taylor V, Berry JL, Khair U, Barley NF, van Heel DA, Field J, Hayat JO, Bhattacharjee A, Jeffery R, Poulosom R. 2006. Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: different relationships to the vitamin D system and aging in men and women. *J. Bone Miner. Res.* 21: 1770-1777.

118. Washo-Stultz D, Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Bernstein C, Bernstein H, Kunke K, Waltmire CN, Garewal H, Payne CM. 2002. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 177: 129-144.
119. Wasserman RH, Taylor AN, Kallfelz FA. 1966. Vitamin D and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. *Am. J. Physiol.* 211:419-423.
120. Wasserman RH. 1997. Vitamin D and the intestinal absorption of calcium and phosphorus. En: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW (eds). *Vitamin D*. San Diego, Academic Press. Pp 259-273.
121. Wasserman RH. 2004. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J. Nutr.* 134: 3137-3139.
122. Webling DD, Holdsworth ES. 1965. The effect of bile, bile acids and detergents on calcium absorption in the chick. *Biochem. J.* 97: 408-421.
123. Webling DD, Holdsworth ES. 1966. Bile salts and calcium absorption. *Biochem. J.* 100: 652-660.
124. Xiao Y, Cui J, Shi YH, Sun J, Wang ZP, Le GW. 2010. Effects of duodenal redox status on calcium absorption and related genes expression in high-fat diet-fed mice. *Nutrition.* 26: 1188-1194.
125. Yang H, Ramani K, Xia M, Ko KS, Li TW, Oh P, Li J, Lu SC. 2009. Dysregulation of glutathione synthesis during cholestasis in mice: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Hepatology.* 49: 1982-1991.

126. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. 1998. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*. 16: 2265-2282.