

MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDAD EN LA SOBRECARGA ALUMÍNICA

I. GONZÁLEZ SUÁREZ, J.L. FERNÁNDEZ MARTÍN
Y J.B. CANNATA ANDÍA

SERVICIO DE METABOLISMO ÓSEO Y MINERAL.
INSTITUTO REINA SOFÍA DE INVESTIGACIÓN.
HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS.
OVIEDO. ESPAÑA.

Anteriormente se había observado que el aluminio era capaz de inhibir la síntesis y la secreción de hormona paratiroidea, si bien los mecanismos moleculares subyacentes se desconocían. Estudios recientes han demostrado que dicha inhibición tiene lugar a través de un mecanismo post-transcripcional. Además, el aluminio disminuye la proliferación de las células de la glándula paratiroides de un modo similar al calcio, el principal regulador de la función paratiroidea. Por último, el aluminio es también capaz de activar el receptor-sensor de calcio a concentraciones micromolares, lo que demuestra que éste es el mecanismo por el que las glándulas paratiroides respondían al metal. En conjunto, estos resultados demuestran por primera vez que las acciones del aluminio sobre la función paratiroidea tienen lugar a través de un mecanismo similar al del calcio. Además, dicho efecto es consecuencia de la baja especificidad del receptor-sensor del calcio.

PALABRAS CLAVE: aluminio, calcio, glándula paratiroides, receptor-sensor de calcio.

Aluminum (Al) is able to inhibit parathyroid hormone (PTH) synthesis and secretion, although the subjacent molecular mechanisms are unknown. Recent studies have shown that this inhibition occurs through a post-transcriptional mechanism. Similarly to calcium, the main regulator of parathyroid function, Al also decreases parathyroid cell proliferation. Finally, Al is also able to activate the calcium-sensing receptor (CaR) at the micromolar level, thus demonstrating that this is the mechanism by which parathyroid glands sense the metal. In summary these results show for the first time that Al-induced impairment of parathyroid function is a calcium-like mechanism. In addition, this effect is the consequence of a low specificity of the CaR.

KEY WORDS: aluminum, calcium, parathyroid gland, calcium-sensing receptor.

ALUMINIO E INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA. FUENTES DE EXPOSICIÓN

El aluminio (Al) constituye aproximadamente el 8% de la superficie terrestre y se encuentra ampliamente diseminado a lo largo de la misma, por tanto, el riesgo de exposición sería, en principio, elevado¹. Sin embargo, los niveles corporales de Al suelen ser bajos, lo que sugiere la existencia de mecanismos protectores frente a su acumulación. La piel y los pulmones constituyen una barrera de protección muy efectiva, por lo que, en condiciones normales, las únicas vías de exposición serían los alimentos y el agua de bebida². La ingesta diaria de aluminio a través de la dieta es, en general, baja³ y su absorción intestinal es reducida, por lo que la mayor parte se elimina con las heces. La re-

ducida cantidad de Al absorbido se excreta a través de la orina en menos de 48 horas⁴.

Por el contrario, en la insuficiencia renal crónica (IRC) la situación es más comprometida, ya que, los enfermos tienen un riesgo de exposición al Al mucho mayor que la población general. Las soluciones de diálisis contaminadas han sido tradicionalmente la vía fundamental de exposición al Al en los enfermos renales. En estos casos, las consecuencias pueden ser muy graves, ya que se eluden las barreras naturales de protección y el Al penetra directamente al torrente circulatorio^{5,6}. A esto hay que añadir que, debido a la pérdida de la función renal, estos pacientes no pueden excretar el metal absorbido a través de la orina de una forma eficaz. Existe, además, una fuente de exposición adicional a través de la utilización de hidróxido de aluminio como captor de fósforo en el tubo digestivo. Esta vía es también importante, ya que la ingesta de Al de algunos enfermos llega a ser hasta 1.000 veces superior a la de un individuo sano^{1,7}. Además, en la IRC la barrera protectora que supone el epitelio intestinal es menos eficiente¹, lo que incrementa la absorción del metal.

A lo largo de las últimas décadas, la introducción de los sistemas de tratamiento de aguas en las unidades de diálisis, junto con el desarrollo de nuevos captosres de fósforo, han logrado disminuir la prevalencia y las manifestaciones más graves de la sobrecarga alumínica⁸. En la actualidad, el riesgo de intoxicación alumínica aguda es bajo, aunque todavía se dan casos de exposición accidental al metal⁸⁻¹⁰. Por el contrario, el riesgo de intoxicación crónica continúa siendo elevado, entre otras razones, porque aún son muchos los pacientes con IRC que reciben sales de Al como captosres de fósforo¹¹. Esto explicaría, al menos en parte, por qué se encuentran todavía pacientes con enfermedad ósea inducida por Al incluso en países como España, donde se cuenta con tecnología y medidas de control eficaces desde hace mucho tiempo¹²⁻¹⁶.

MECANISMOS DE TOXICIDAD ALUMÍNICA EN EL HUESO

Las alteraciones del metabolismo óseo secundarias a la sobrecarga alumínica son la consecuencia más importante de la exposición al metal en los pacientes con IRC. La mayoría de los enfermos desarrolla un

Correspondencia: J.B. Cannata Andía.
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral.
Instituto Reina Sofía de Investigación.
Hospital Universitario Central de Asturias.
C/ Julián Clavería s/n. 33006 Oviedo. España.
Correo electrónico: metoseo@hca.es

tipo de osteodistrofia renal conocida como osteomalacia, caracterizada por una escasa mineralización del osteoide¹⁷. En la mayoría de los casos la reducida formación ósea se correlaciona con un importante cúmulo de Al localizado en el frente de mineralización (zona límite del osteoide no calcificado) que habitualmente sobrepasa el 15% de la superficie ósea. Sin embargo, hay otros casos, en los que el volumen de osteoide es normal o incluso está disminuido, lo que supone un tipo de osteodistrofia diferente, conocida como enfermedad ósea adinámica.

La gran diversidad en las lesiones óseas de los pacientes con IRC sugiere un efecto del Al sobre el metabolismo óseo a distintos niveles. Aunque la patogenia de la enfermedad aún no está plenamente esclarecida, son varios los mecanismos propuestos, los cuales podrían agruparse en: efectos directos sobre el hueso y efectos indirectos sobre las glándulas paratiroides. A través de un mecanismo físico-químico directo, el Al se incorpora a los cristales de hidroxiapatita, impidiendo su crecimiento y con ello la correcta deposición de calcio en el hueso^{18,19}. El metal sería además capaz de regular el metabolismo de las células óseas. Así, varios autores han observado que el Al disminuye el número y actividad de los osteoblastos^{17,20,21}, lo que constituiría un mecanismo adicional de inhibición de la mineralización.

Por otra parte, ya en los primeros casos de intoxicación aluminica se describió la existencia de un hipoparatiroidismo relativo, con niveles de hormona paratiroidea (PTH) bajos y un recambio óseo muy reducido para el grado de insuficiencia renal²². A esto hay que añadir que las glándulas paratiroides de aquellos pacientes fallecidos con osteomalacia fracturante tenían un peso menor que las del resto de los pacientes con hiperparatiroidismo secundario²². Todos estos hallazgos sugerían la existencia de un efecto indirecto del Al sobre el hueso, a través de su acción sobre las glándulas paratiroides.

EFFECTOS INDIRECTOS: ALUMINIO Y GLÁNDULA PARATIROIDES

En 1983 se describió por primera vez una relación entre la hiperaluminemia y el des-

censo en los niveles de PTH en pacientes en diálisis expuestos accidentalmente a altas concentraciones de Al¹⁹. Este descenso en la PTH se asoció inicialmente con un incremento del calcio sérico secundario a la acumulación de Al en el hueso, que impediría la correcta mineralización del osteoide. Sin embargo, casi al mismo tiempo se observó, tanto en pacientes en diálisis con hipocalcemia^{23,24} como en células paratiroides cultivadas *in vitro*²⁵, un efecto inhibitorio directo, calcio-independiente, del Al sobre la liberación de la hormona. Desde entonces, multitud de estudios han demostrado la capacidad del Al para inhibir la secreción de PTH y favorecer su degradación. Dicha inhibición se produce además en cuestión de minutos, lo que sugeriría un efecto mediado por receptor^{17,26}.

En el año 2000, Smans et al²⁷ describieron *in vitro* una inhibición dosis dependiente del complejo aluminio-transferrina sobre la secreción de PTH, pero no sobre su síntesis. Esta inhibición no se observaba con otros transportadores, como el citrato, por lo que se postuló que las células paratiroides podrían incorporar AP a través del receptor de la transferrina. Hasta la fecha ningún estudio había encontrado un efecto del Al sobre la síntesis de PTH, por lo que esta hipótesis parecía viable. En el año 2001, sin embargo, nuestro grupo demostró por primera vez un efecto inhibitorio dosis-dependiente del Al sobre los niveles de ARNm de PTH en un modelo de intoxicación aluminica *in vivo*²⁸, lo que no se correlacionaba con los resultados de Smans. Es más, cuando tratamos de repetir nuestros resultados con la PTH *in vivo* utilizando glándulas paratiroides de rata cultivadas *in vitro* durante 24 horas en presencia de aluminio unido a transferrina (Al-Tf), sólo observamos una inhibición en la secreción de PTH, no así en su síntesis²⁹. Por el contrario, cuando el tejido se cultivó con suero de rata saturado de aluminio (Al-suero), se observó una rápida inhibición tanto de la síntesis como de la secreción de la hormona. Estos resultados sugerían que, si bien el receptor de transferrina podría estar implicado en algunas de las acciones del Al, no parecía ser el responsable de todas ellas.

Por otro lado, la mayoría de los estudios con el Al se han llevado a cabo en condi-

ciones de normocalcemia, e incluso de hipocalcemia, lo que indica que los efectos del Al son independientes de calcio. A pesar de ello, todos los resultados observados son análogos a los previamente descritos para el calcio^{30,31}, hecho que sugiere que ambos cationes podrían compartir el mismo mecanismo de acción.

REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PARATIROIDEA POR ALUMINIO

El calcio extracelular es el principal regulador de la PTH y ejerce sus acciones en la glándula paratiroides a través del receptor-sensor de calcio (CaR), una molécula que pertenece a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G y que se expresa en múltiples tejidos, incluidos hueso, riñón y paratiroides³².

Del mismo modo, la hormona se encarga de regular la calcemia a través de un mecanismo de retroalimentación^{32,33}. Esta regulación recíproca entre calcio y PTH, esencial para el mantenimiento de la homeostasis mineral, tiene dos componentes principales: el control de la síntesis y secreción de la hormona a corto plazo y el control de la proliferación de las células de la glándula a largo plazo³⁴. De este modo, la demanda de niveles de PTH elevados en un momento dado, por ejemplo en caso de una hipocalcemia, se compensaría rápidamente con un incremento en la síntesis y secreción de la hormona. Si esta demanda se prolongase en el tiempo, como ocurre en los enfermos con IRC, se necesitaría además incrementar el número de células secretoras y se produciría la hiperplasia de las glándulas paratiroides³⁴.

ALUMINIO Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Los resultados en pacientes con hiperparatiroidismo neonatal severo y en ratones mutantes nulos para el CaR han establecido una asociación entre el aumento de la proliferación celular en el tejido paratiroideo y el descenso en la expresión del receptor^{35,36}. Este descenso es, además, se-

cundario a la aparición de la hiperplasia³⁷ y más pronunciado en las zonas de crecimiento nodular, asociadas a un hiperparatiroidismo más severo^{32,38,39}. Gracias a estos estudios, se ha logrado establecer una relación entre calcio, CaR y proliferación. De hecho, parece que este receptor es el principal responsable de los efectos antiproliferativos del calcio. Recientemente, Roussane et al⁴⁰ han observado un aumento de la proliferación al exponer células paratiroides aisladas, en las cuales los niveles de CaR funcional estaban reducidos, a niveles elevados de calcio^{41,42}. Sin embargo, la exposición al calcimimético NPS R-467, que actúa de modo específico sobre el CaR, producía el efecto contrario. Estos resultados sugieren que el calcio puede regular la división celular a través de diferentes vías. Así, cuando la expresión de CaR es elevada el efecto neto sería el bloqueo de la proliferación celular, mientras que si los niveles de receptor disminuyen predominaría el efecto estimulador^{33,40}.

El Al produce, a corto plazo, los mismos efectos que el calcio sobre la función paratiroidea; esto es, inhibición de la síntesis y secreción de la PTH. A más largo plazo, se ha descrito que disminuye la proliferación celular y favorece la apoptosis en cultivos primarios de astrocitos^{43,44} y osteoblastos⁴⁵. En estos últimos las acciones del Al parecen estar además mediadas por el CaR. En el caso de las glándulas paratiroides, nuestro grupo ha demostrado, tanto en un modelo de intoxicación aluminica en animales nefrectomizados⁴⁶ como en tejido paratiroideo cultivado *in vitro* con Al-suero²⁹, que el Al inhibe en más de un 90% el número de células en proliferación en tan sólo 24 horas. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en presencia de niveles de calcio elevados^{47,48} o de calcimiméticos^{33,49}, lo que indica, no sólo que el Al es un potente inhibidor de la proliferación celular, sino también que dichos efectos podrían estar mediados por el CaR.

ALUMINIO Y ACTIVACIÓN DEL CaR

Desde su clonación en 1993, el CaR ha demostrado que es un receptor promiscuo⁵⁰, que responde a muchas otras subs-

tancias además de al calcio, incluyendo cationes divalentes y trivalentes^{50,51} cationes polivalentes³², aminoácidos aromáticos⁵², péptidos amiloides β ⁵³, e incluso a la fuerza iónica⁵⁴. Por otra parte, algunos de los efectos del Al sobre el metabolismo de los osteoblastos son similares a los descritos previamente para el calcio y otros agonistas del CaR como el gadolinio y la neomicina^{55,56}. Este hecho apoyaría la existencia de un mecanismo de inhibición de la PTH común para calcio y Al, el cual sería además consecuencia de una falta de especificidad del CaR.

En 1999, Spurney et al⁵⁷ describieron que el $AlCl_3$ en solución acuosa era capaz de activar *in vitro* el CaR. Sin embargo, dicha activación sólo se producía a concentraciones muy por encima del rango fisiológico (alrededor de 1 mM), lo que sugería un efecto inespecífico sobre el receptor. Además, tanto nuestro grupo como otros investigadores habíamos demostrado que las acciones del Al tienen lugar a concentraciones micromolares^{13,27,58,59}, por tanto, no parecía probable que el CaR pudiera mediar las acciones celulares del Al. No obstante, hay que extremar las precauciones cuando se trabaja con soluciones acuosas de $AlCl_3$ a pH fisiológico, ya que el Al tiende a precipitar en forma de hidróxido y los niveles de metal soluble se reducen considerablemente⁶⁰.

Este fenómeno ya había sido observado con anterioridad en dos estudios de Morrissey et al^{25,61}. En el primero de ellos, los autores demostraron un efecto inhibitorio *in vitro* del Al sobre la secreción de la PTH. Dicha inhibición se producía a concentraciones elevadas (aproximadamente 1-2 mM), muy similares a las que se describen en el estudio de Spurney. Posteriormente, cuando se analizaron los niveles de Al en solución, se observó que las concentraciones de metal que inhibían la PTH eran en realidad mucho menores (aproximadamente 5-15 μM), y que los resultados anteriores eran consecuencia de una precipitación no controlada de hidróxido de aluminio.

A la vista de estos datos, decidimos determinar la capacidad del Al para activar el CaR a concentraciones en el rango de las que presentan los enfermos con IRC. Para ello se utilizaron células HEK-293 transfectadas con el CaR humano²⁹, un

modelo que permite trabajar en condiciones libres de calcio y otros iones que pudieran interaccionar con el receptor y enmascarar el efecto del Al. Además, para evitar la precipitación del metal, se probaron distintos transportadores fisiológicos de Al. Desafortunadamente, todos ellos interfirieron de algún modo con el sistema de detección y nos vimos forzados a utilizar $AlCl_3$ como fuente de Al. Teniendo en cuenta el riesgo de precipitación del Al y dado que no se puede incrementar su solubilidad (por ejemplo disminuyendo el pH) sin afectar las condiciones del experimento, se cuantificaron los niveles de metal soluble mediante espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito.

El análisis de los medios celulares confirmó que los niveles de Al solubilizado eran menores de los esperados. Así, la adición de $AlCl_3$ 10 μM y 25 μM al medio de cultivo se tradujo en unos niveles de Al en solución de 7,5 y 17,5 μM respectivamente. Es más, a pesar del amplio rango de concentraciones utilizado ($AlCl_3$ 10 μM -1 mM) no fue posible incrementar la concentración del metal soluble por encima de 17,5 μM . A pesar de ello, hemos observado que una concentración de aluminio de tan sólo 7,5 μM incrementa significativamente el grado de activación del receptor en un 19%. Se trata además de un efecto dosis dependiente, ya que al aumentar la concentración de Al hasta 17,5 μM , el grado de activación del CaR se incrementó hasta el 45%. Estos valores de Al son mucho menores que los descritos por Spurney, pero muy similares a los descritos en el segundo de los estudios de Morrissey, en el que se describía la precipitación no controlada de Al⁶¹. Además, cuando comparamos nuestros resultados con los obtenidos para el calcio, se requieren concentraciones de calcio entre sesenta y cien veces superiores a las de Al para alcanzar el mismo grado de activación en el receptor²⁹. Este dato demuestra que el Al es un potente agonista del CaR. De hecho, resultados derivados del estudio con glándulas paratiroides cultivadas *in vitro* antes mencionado²⁹ sugieren que calcio y Al podrían compartir los sitios de unión al CaR.

Durante la puesta a punto del modelo de cultivo fue necesario optimizar la concen-

tración de calcio en el medio de cultivo para evitar posibles interferencias, ya que tanto la hipocalcemia como la hipercalemia tienen efectos dramáticos sobre la función paratiroidea. Tras 24 horas de cultivo en un medio con calcio alto, ni el Al-Tf ni el Al-suero fueron capaces de inhibir la síntesis de la PTH. Por el contrario, en el medio con calcio bajo, ambos transportadores de Al inhibieron la secreción de la PTH alrededor de un 50%, aunque sólo el Al-suero consiguió reducir la síntesis de la hormona de un modo similar al observado por nuestro grupo *in vivo*²⁸. Los resultados sugieren un efecto competitivo de calcio y aluminio en el CaR. En un medio con calcio alto, el receptor estaría completamente saturado y no habría sitios de unión disponibles para el Al. Por el contrario, en un medio con calcio bajo, el Al dispondría de sitios de unión libres en el CaR y se produciría un descenso de los niveles de ARNm de PTH. Los efectos aditivos en la activación del CaR por calcio ya se han descrito para algunos cationes como el plomo o el hierro⁵⁰ pero no para el Al, por lo que serían necesarios estudios adicionales para demostrarlo. Por otra parte, el hecho de que el Al-Tf haya sido capaz de inhibir la secreción de PTH pero no la síntesis en un medio con calcio bajo está de acuerdo con los resultados de Smans²⁷ y apoya la idea de que el receptor de transferrina puede estar implicado en el control de la liberación de hormona, pero que no es la vía por la que el Al ejerce sus acciones en la paratiroides. En conjunto, nuestros resultados demuestran que, si bien el Al puede activar el CaR sin necesidad de calcio, ambos cationes pueden tener un efecto aditivo (e incluso competitivo) en la activación del receptor. Este hecho explicaría, no sólo cómo el metal modifica la función paratiroidea, sino también por qué en los primeros estudios sobre la intoxicación aluminica se observaba hipocalcemia y menores niveles de PTH en los pacientes con IRC.

ALUMINIO Y REGULACIÓN DEL GEN DE LA HORMONA PARATIROIDEA

El sistema calcio-CaR regula la síntesis de la PTH a través de un mecanismo post-

transcripcional, como en el caso de la hiperfosforemia. De este modo, la variación en los niveles de $[Ca^{2+}]_E$ no tendría un efecto directo sobre la tasa de transcripción del gen de la PTH, sino sobre la estabilidad del ARNm de la hormona una vez éste abandona el núcleo⁶².

En el caso del Al, para determinar el mecanismo de inhibición de la síntesis de PTH se llevaron a cabo ensayos de *run-on* nuclear en glándulas paratiroides cultivadas *in vitro* con Al-suero. Este tipo de experimentos se basa en el aislamiento y purificación de los núcleos celulares de las glándulas cultivadas. Una vez purificados, los núcleos se someten a un proceso de transcripción *in vitro* en presencia de los distintos ribonucleótidos que conforman el ARN, uno de ellos marcado radiactivamente. El producto de la transcripción (ARN *de novo*) se hibrida con sondas específicas y se cuantifica la tasa de transcripción de los genes de interés. De modo simultáneo, durante el proceso de aislamiento de los núcleos, se aisló y purificó el ARNm del citoplasma de las células. Este procedimiento combinado permite estudiar, en el mismo tejido y al mismo tiempo, tanto los efectos del aluminio sobre la síntesis de ARN *de novo* que se produce en el núcleo (efecto transcripcional) como sobre los niveles de ARNm que ya han sufrido las modificaciones que tienen lugar en el citoplasma (efecto post-transcripcional).

Los ensayos de *run-on* no mostraron diferencias en la tasa de transcripción del gen de la PTH entre las glándulas cultivadas con el Al-suero y las glándulas control. Sin embargo, el análisis del ARNm citoplasmático mostró una reducción del 77% en los niveles de la PTH del grupo Al. Esto significa que la acción inhibitoria del Al no tiene lugar durante la transcripción del gen de la PTH, sino una vez que el ARN abandona el núcleo; por tanto se trata de un mecanismo de inhibición post-transcripcional.

Este resultado se une a una larga lista de coincidencias entre calcio y Al que demuestran, no sólo que el Al regula el metabolismo de la glándula paratiroides imitando los efectos del calcio (*calcimimético de tipo I*), sino también que la baja especificidad del CaR es esencial para que este proceso tenga lugar.

ALUMINIO Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CaR

La expresión del CaR (tanto de ARNm como de proteína) puede verse modificada en multitud de circunstancias³². Sin embargo, los mecanismos subyacentes a dichas variaciones aún no se conocen en su totalidad. Varios estudios han observado un dramático descenso en la expresión de CaR en cultivos de células paratiroides aisladas o en monocapa^{41,63} pero no cuando las glándulas se cultivan enteras, en fragmentos o en láminas⁶⁴, lo que sugiere que la expresión del CaR depende de la estructura tridimensional del tejido. De hecho, cuando se cultivan células paratiroides aisladas en una matriz de colágeno que permite la reagrupación de las mismas de una forma similar a la del tejido paratiroideo (pseudoglándula), la expresión del receptor se recupera⁴².

En cualquier caso, y a pesar de que se trata de un receptor de calcio, su expresión en glándulas paratiroides y en riñón no parece depender de los niveles de $[Ca^{2+}]_E$. Los estudios realizados en ratas suplementadas con calcio no encontraron diferencias en la expresión de CaR ni en riñón ni en paratiroides^{65,66}. Sin embargo, otros autores han descrito un aumento en los niveles de CaR en la tibia de ratas con IRC y dieta alta en calcio, aunque la expresión del receptor en paratiroides y/o riñón no llegó a evaluarse⁶⁷.

En el caso del Al, teniendo en cuenta la estrecha relación entre el CaR y la proliferación, cabría la posibilidad de que sus efectos antiproliferativos estuvieran causados por un cambio en la expresión de CaR. De hecho, cuando se analizó la síntesis de CaR en el modelo *in vitro*²⁹ se observó un descenso del 60% en los niveles de ARNm del receptor en las glándulas cultivadas con Al-suero. Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios transcripcionales para determinar el mecanismo de esta inhibición. Los ensayos de *run-on* nuclear no mostraron diferencias entre los grupos control y Al en la tasa de transcripción del gen del CaR. No obstante, el análisis de los niveles citoplasmáticos de ARNm mostró un descenso del 75% en el grupo tratado con Al-suero. Por lo tanto, y al igual que en el caso de la PTH, el

Al inhibe post-transcripcionalmente la síntesis del CaR. Sorprendentemente, y a diferencia de lo que ocurre con la hormona, no se pudo establecer una correlación entre el descenso de los niveles de ARNm y los de proteína. En los experimentos *in vitro*²⁹, esta falta de concordancia se explicaría por el hecho de que 24 horas de cultivo podría ser un tiempo demasiado corto para apreciar cambios en una proteína tan compleja como el CaR. Sin embargo, en nuestro estudio *in vivo*⁴⁶ los animales habían estado expuestos al Al durante ocho semanas, período más que suficiente para observar los posibles efectos en la proteína.

Existe, no obstante, la posibilidad de que esta aparente falta de resultados se hubiera debido a un problema metodológico. Recientemente, Kifor et al⁶⁸ han postulado la existencia en el tejido paratiroideo de un mecanismo de protección frente a la activación prolongada del CaR. Este receptor se encuentra en la membrana plasmática de las células, próximo a unos compartimentos subcelulares denominados caveolas^{69,70}, cuya función es regular procesos de señalización mediados por calcio^{71,72}. En estas estructuras se localiza un tipo específico de proteasas dependientes de calcio denominadas calpaínas. La activación del CaR provoca su translocación al interior de las caveolas, incrementando los niveles de calcio dentro de las mismas. En caso de una activación prolongada del CaR, como habría ocurrido en las glándulas paratiroides cultivadas 24 horas con Al-suero o al exponer animales nefrectomizados durante 8 semanas a concentraciones elevadas del metal, el calcio acumulado en las caveolas provocaría la activación de las calpaínas. Estas proteasas no provocarían la degradación completa del CaR^{73,74}, sino que lo inactivarían mediante un procesamiento proteolítico entre los residuos 117 y 137, una región del dominio extracelular crítica para la funcionalidad del receptor^{68,75}.

En todos nuestros estudios, hemos utilizado un anticuerpo policlonal³⁸ que reconoce un fragmento de la proteína entre los residuos 203 y 226. Este epítipo está situado por debajo del lugar de corte de la proteasa, en la parte del receptor que quedaría anclada a la membrana tras la proteólisis. Por lo tanto, no habría sido posi-

ble detectar el procesamiento proteolítico de la calpaína en caso de que éste se hubiera producido. No obstante, esta afirmación es tan sólo especulativa y serán necesarios nuevos estudios con anticuerpos apropiados que lo demuestren.

CONCLUSIONES

La enfermedad ósea inducida por Al ha constituido una de las principales complicaciones para los pacientes con IRC durante mucho tiempo. Hoy en día, los sistemas de tratamiento de aguas en las unidades de diálisis y el desarrollo de nuevos captadores de fósforo han logrado disminuir la prevalencia y las manifestaciones más graves de la intoxicación aluminica, si bien no han conseguido erradicarla completamente. Por otro lado, tras años de estudio los mecanismos moleculares mediante los cuales el Al altera la función paratiroidea sólo han comenzado a desentrañarse recientemente. De hecho, hasta hace muy poco, ni siquiera se conocía cómo eran capaces las glándulas paratiroides de responder al Al.

En el presente trabajo, se resumen los hallazgos que nuestro grupo y otros autores han ido describiendo a lo largo de las últimas dos décadas. En conjunto, todos ellos demuestran que el Al tiene los mismos efectos que el calcio sobre la función paratiroidea, porque se comporta como un calcimimético de tipo I. Además, en este proceso la reducida especificidad del CaR desempeña un papel fundamental. Por último, y al igual que ocurre con la PTH, el Al regula la expresión del CaR a través de un mecanismo post-transcripcional. En este caso, sin embargo, el descenso en la síntesis de CaR no se correlacionó con una disminución en los niveles de proteína en el tejido, por lo que serán necesarios nuevos estudios que profundicen en este aspecto.

AGRADECIMIENTOS

Ignacio González Suárez es becario del Fondo de Investigaciones Sanitarias (programa BEFI 2002). Estos estudios han sido financiados por proyectos FIS (01/0294 y 02/0688) y por el Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Druke TB. Intestinal absorption of aluminium in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17 Suppl 2:13-6.
2. Yokel RA, McNamara PJ. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol Toxicol*. 2001;88:159-67.
3. Yokel RA, Rhineheimer SS, Brauer RD, Sharma P, Elmore D, McNamara PJ. Aluminium bioavailability from drinking water is very low and is not appreciably influenced by stomach contents or water hardness. *Toxicology*. 2001;161: 93-101.
4. Druke TB, Jouhannau P, Banide H, Lacour B, Yiou F, Raisbeck G. Effects of silicon, citrate and the fasting state on the intestinal absorption of aluminium in rats. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92:63-7.
5. Ward MK, Feest TG, Ellis HA, Parkinson IS, Kerr DN. Osteomalacic dialysis osteodystrophy: Evidence for a water-borne aetiological agent, probably aluminium. *Lancet*. 1978;1: 841-5.
6. Savory J, Wills MR. Dialysis fluids as a source of aluminum accumulation. *Contrib Nephrol*. 1984;38:12-23.
7. Grosso S, Fernández-Martín JL, Gómez Alonso C, Barreto S, Díaz Corte C, Cannata Andía J. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la intoxicación aluminica en España. *Nefrología*. 1996;16:158-66.
8. Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL. The clinical impact of aluminium overload in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 2:9-12.
9. BBC News. Disease link to water poisoning. In; 2005. <http://news.bbc.co.uk>
10. Berend K, van der Voet G, Boer WH. Acute aluminum encephalopathy in a dialysis center caused by a cement mortar water distribution pipe. *Kidney Int*. 2001;59:746-53.
11. Lorenzo V, Martín-Malo A, Pérez-García R, Torregrosa JV, Vega N, de Francisco AL, et al. Prevalence, clinical correlates and therapy cost of mineral abnormalities among haemodialysis patients: a cross-sectional multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2005.
12. Díaz López JB, Jorgetti V, Caorsi H, Ferreira A, Palma A, Menéndez P, et al. Epidemiology of renal osteodystrophy in Iberoamerica. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13 Suppl 3:41-5.
13. Kausz AT, Antonsen JE, Hercz G, Pei Y, Weiss NS, Emerson S, et al. Screening plasma aluminum levels in relation to aluminum bone disease among asymptomatic dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1999;34:688-93.
14. Monier-Faugere MC, Malluche HH. Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 3:111-20.
15. Mereu MC, Bolasco PG, Pinna A, Carzedda LG, Branca GF, Di Lauro L, et al. The management of osteodystrophy in uremic patients: the first Sardinian audit. *G Ital Nefrol*. 2004;21: 362-70.

16. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul MC. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1943-51.
17. Cannata-Andía JB. Hypokinetic azotemic osteodystrophy. *Kidney Int.* 1998;54:1000-16.
18. Jeffery EH, Abreo K, Burgess E, Cannata J, Greger JL. Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney. *J Toxicol Environ Health.* 1996;48:649-65.
19. Cannata JB, Briggs JD, Junor BJ, Fell GS, Bestall G. Effect of acute aluminium overload on calcium and parathyroid-hormone metabolism. *Lancet.* 1983;1:501-3.
20. Rodríguez M, Felsenfeld AJ, Llach F. Aluminum administration in the rat separately affects the osteoblast and bone mineralization. *J Bone Miner Res.* 1990;5:59-67.
21. Goodman WG. Bone disease and aluminum: pathogenic considerations. *Am J Kidney Dis.* 1985;6:330-5.
22. Fernández Martín JL, Díaz Corte C, Cannata Andía J. Sobrecarga alumínica en la insuficiencia renal crónica. En: Valderrábano F, editor. *Tratado de Hemodiálisis.* Barcelona: Editorial Médica JIMS S.L.; 1999. p. 375-84.
23. Kraut JA, Shinaberger JH, Singer FR, Sherrard DJ, Saxton J, Miller JH, et al. Parathyroid gland responsiveness to acute hypocalcemia in dialysis osteomalacia. *Kidney Int.* 1983;23:725-30.
24. Cannata JB, Díaz López JB, Fernández Menéndez MJ, Virgos MJ. The parathyroid gland and aluminum overload: an overview. *Contrib Nephrol.* 1988;64:113-9.
25. Morrissey J, Rothstein M, Mayor G, Slatopolsky E. Suppression of parathyroid hormone secretion by aluminum. *Kidney Int.* 1983;23:699-704.
26. Slatopolsky E. The interaction of parathyroid hormone and aluminum in renal osteodystrophy. *Kidney Int.* 1987;31:842-54.
27. Smans KA, D'Haese PC, Van Landeghem GF, Andries LJ, Lamberts LV, Hendy GN, et al. Transferrin-mediated uptake of aluminium by human parathyroid cells results in reduced parathyroid hormone secretion. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1328-36.
28. Díaz-Corte C, Fernández-Martín JL, Barreto S, Gómez C, Fernández-Coto T, Braga S, et al. Effect of aluminium load on parathyroid hormone synthesis. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:742-5.
29. González-Suárez I, Álvarez-Hernández D, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, Luis Fernández-Martín J, Cannata-Andía JB. Aluminium posttranscriptional regulation of parathyroid hormone synthesis: a role for the calcium-sensing receptor. *Kidney Int.* 2005;68:2484-96.
30. Jüppner H, Kronenberg HM. Parathyroid hormone. En: Favus MJ, editor. *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 5th ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2003. p. 117-24.
31. Silver J, Moallem E, Kilav R, Epstein E, Sela A, Naveh-Manly T. New insights into the regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11 Suppl 3:2-5.
32. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 2001;81:239-97.
33. Wada M, Nagano N. Control of parathyroid cell growth by calcimimetics. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 3:iii13-7.
34. Parfitt AM. The hyperparathyroidism of chronic renal failure: a disorder of growth. *Kidney Int.* 1997;52:3-9.
35. Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB, et al. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat Genet.* 1995;11:389-94.
36. Brown EM, Chattopadhyay N, Vassilev PM, Hebert SC. The calcium-sensing receptor (CaR) permits Ca²⁺ to function as a versatile extracellular first messenger. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:257-80; discussion 280-1.
37. Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA, Brown AJ. Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int.* 2001;60:1737-44.
38. Brown AJ, Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA. Decreased calcium-sensing receptor expression in hyperplastic parathyroid glands of uremic rats: role of dietary phosphate. *Kidney Int.* 1999;55:1284-92.
39. Valimaki S, Farnebo F, Forsberg L, Larsson C, Farnebo LO. Heterogeneous expression of receptor mRNAs in parathyroid glands of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2001;60:1666-75.
40. Roussanne MC, Lieberherr M, Souberbielle JC, Sarfati E, Druke T, Bourdeau A. Human parathyroid cell proliferation in response to calcium, NPS R-467, calcitriol and phosphate. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:610-6.
41. Mithal A, Kifor O, Kifor I, Vassilev P, Butters R, Krapcho K, et al. The reduced responsiveness of cultured bovine parathyroid cells to extracellular Ca²⁺ is associated with marked reduction in the expression of extracellular Ca(2+)-sensing receptor messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology.* 1995;136:3087-92.
42. Ritter CS, Slatopolsky E, Santoro S, Brown AJ. Parathyroid cells cultured in collagen matrix retain calcium responsiveness: importance of three-dimensional tissue architecture. *J Bone Miner Res.* 2004;19:491-8.
43. Suárez-Fernández MB, Soldado AB, Sanz-Medel A, Vega JA, Novelli A, Fernández-Sánchez MT. Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and results in neuronal death. *Brain Res.* 1999;835:125-36.
44. Guo GW, Liang YX. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. *Brain Res.* 2001;888:221-6.
45. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Aluminum accelerates osteoblastic differentiation but is cytotoxic in long-term rat calvaria cell cultures. *Calcif Tissue Int.* 1999;65:59-65.
46. González-Suárez I, Naves M, Díaz-Corte C, Fernández-Martín JL, Menéndez-Rodríguez P, Cannata-Andía JB. Effect of aluminium on calcium-sensing receptor expression, proliferation, and apoptosis of parathyroid glands from rats with chronic renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2003(85):39-43.
47. Brandi ML, Fitzpatrick LA, Coon HG, Aurbach GD. Bovine parathyroid cells: cultures maintained for more than 140 population doublings. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:1709-13.
48. Liu W, Ridefelt P, Akerstrom G, Hellman P. Differentiation of human parathyroid cells in culture. *J Endocrinol.* 2001;168:417-25.
49. Colloton M, Shatzen E, Miller G, Stehman-Breen C, Wada M, Lacey D, et al. Cinacalcet HCl attenuates parathyroid hyperplasia in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2005;67:467-76.
50. Handlogten ME, Shiraishi N, Awata H, Huang C, Miller RT. Extracellular Ca(2+)-sensing receptor is a promiscuous divalent cation sensor that responds to lead. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F1083-91.
51. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 1993;366:575-80.
52. Conigrave AD, Mun HC, Delbridge L, Quinn SJ, Wilkinson M, Brown EM. L-amino acids regulate parathyroid hormone secretion. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38151-9.
53. Ye C, Ho-Pao CL, Kanazirska M, Quinn S, Rogers K, Seidman CE, et al. Amyloid-beta proteins activate Ca(2+)-permeable channels through calcium-sensing receptors. *J Neurosci Res.* 1997;47:547-54.
54. Quinn SJ, Kifor O, Trivedi S, Diaz R, Vassilev P, Brown E. Sodium and ionic strength sensing by the calcium receptor. *J Biol Chem.* 1998;273:19579-86.
55. Quarles LD, Hartle JE, 2nd, Middleton JP, Zhang J, Arthur JM, Raymond JR. Aluminum-induced DNA synthesis in osteoblasts: mediation by a G-protein coupled cation sensing mechanism. *J Cell Biochem.* 1994;56:106-17.
56. Hartle JE, 2nd, Prpic V, Siddhanti SR, Spurney RF, Quarles LD. Differential regulation of receptor-stimulated cyclic adenosine monophosphate production by polyvalent cations in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1996;11:789-99.
57. Spurney RF, Pi M, Flannery P, Quarles LD. Aluminum is a weak agonist for the calcium-sensing receptor. *Kidney Int.* 1999;55:1750-8.
58. Ng AH, Hercz G, Kandel R, Grynblas MD. Association between fluoride, magnesium, aluminum and bone quality in renal osteodystrophy. *Bone.* 2004;34:216-24.
59. Ballanti P, Wedard BM, Bonucci E. Frequency of adynamic bone disease and aluminum storage in Italian uraemic patients—retrospective analysis of 1429 iliac crest biopsies. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:663-7.

60. Burriel Martí F, Lucena Conde F, Arribas Jimeno S, Hernández Méndez J. *Química Analítica Cualitativa*. Madrid: Ed. Paraninfo; 1983; 639-46
61. Morrissey J, Slatopolsky E. Effect of aluminum on parathyroid hormone secretion. *Kidney Int Suppl*. 1986;18:S41-4.
62. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F367-76.
63. Brown AJ, Zhong M, Ritter C, Brown EM, Slatopolsky E. Loss of calcium responsiveness in cultured bovine parathyroid cells is associated with decreased calcium receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;212:861-7.
64. Nielsen PK, Feldt-Rasmussen U, Olgaard K. A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:1762-8.
65. Rogers KV, Dunn CK, Conklin RL, Hadfield S, Petty BA, Brown EM, et al. Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid glands and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*. 1995;136:499-504.
66. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, McCracken R, Morrissey J, et al. Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol*. 1996;270:F454-60.
67. Kuizon BD, Salusky IB, Shoback D, Cambia E, Jueppner H, Goodman WG. Increased calcium-sensing receptor expression in calcium-supplemented rats with renal failure. *Bone*. 2001;28:134.
68. Kifor O, Kifor I, Moore FD Jr, Butters RR Jr, Brown EM. m-Calpain colocalizes with the calcium-sensing receptor (CaR) in caveolae in parathyroid cells and participates in degradation of the CaR. *J Biol Chem*. 2003;278: 31167-76.
69. Kifor O, Díaz R, Butters R, Kifor I, Brown EM. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem*. 1998;273:21708-13.
70. Isshiki M, Ying YS, Fujita T, Anderson RG. A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *J Biol Chem*. 2002;277:43389-98.
71. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:199-225.
72. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing «preassembled signaling complexes» at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1998;273:5419-22.
73. Perrin BJ, Huttenlocher A. Calpain. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34:722-5.
74. Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett*. 1998;433:1-4.
75. Reyes-Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PJ, Spiegel AM. Human Ca²⁺ receptor extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. *J Biol Chem*. 2001;276: 32145-51.