



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A. C.**

**EFFECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA EN LA ACTIVIDAD DE
LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE RIÑÓN DE
CERDO (pkBADH)**

Por:

Ramsés de Jesús Cruz Valencia

TESIS APROBADA POR LA

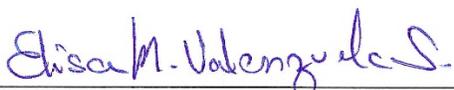
COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ramsés de Jesús Cruz Valencia, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Directora de Tesis



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Co-director

Dra. Rosina Cabrera Ruiz
Integrante del comité



Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Integrante del comité

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ramsés de Jesús Cruz Valencia, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Directora de Tesis

Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Co-director



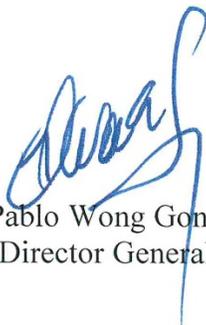
Dra. Rosina Cabrera Ruiz
Integrante del comité

Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Integrante del comité

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efecto de la Ciclofosfamida en la Actividad de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de Riñón de Cerdo” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Ramsés de Jesús Cruz Valencia, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por las facilidades otorgadas y el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación y Desarrollo A.C. por darme la oportunidad y abrirme sus puertas para realizar mis estudios en sus instalaciones.

Al laboratorio de proteínas de estrés, por aguantarme estos dos años y espero sean más años. A la Dra. Elisa Valenzuela, M.C. Ciria Figueroa.

A mi familia, mis padres Elsa y Cipriano, a mi hermano Guillermo, a mi tío Guillermo por siempre apoyarme en los momentos difíciles y darme ánimo para lograr cualquier cosa que me proponga.

A mi hijo Luis Pablo que fue el principal motor para lograr esta meta.

A mis compañeros de laboratorio, que se convirtieron en grandes amigos y me ayudaron en momentos difíciles de mi vida Cesar, Fernanda, Andrea y siempre tuvieron palabras de apoyo, “si sale el trabajo” como dice Cesar y si salió bro.

A mis amigos con lo que conviví durante la maestría y los considero amigos para la toda la vida. A Dr. Aldo, Don Gerardo, Abel, Gerardo, Humberto, Luis, Nicolás, Cristian, Ildefonso, Paul

A departamento de ciencias de los alimentos, por darme la oportunidad de entrar y lograr esta está en mi vida.

Muchas gracias dios por permitirme lograr esto

A todos, muchas gracias

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mi hijo, a mi familia, a mis tutores y amistades, las cuales confiaron en mí y me dieron su apoyo para ampliar mi conocimiento y alcanzar mis metas. Quiero agradecer a la Dra. Elisa Valenzuela Soto por su guía para continuar en los momentos difíciles y sobre todo agradecerle la confianza que me dio, porque más que mi directora de tesis se convirtió en una segunda madre y me ayudó a madurar, fue más allá de lo académico para lograr que sea una persona de bien y logró que recuperará la confianza en mis conocimientos y habilidades, estaré agradecido de por vida con ella. Gracias a dios por guiarme a este lugar donde crecí tanto y encontré a magnificas personas que me ayudaron, que dios los bendiga a todos ellos.

Le dedico esta tesis a mi hijo Luis Pablo, tú hijo fuiste mi mayor inspiración para poder culminar este trabajo, fuiste mi motor en los momentos más difíciles te amo hijo y eres mi mayor premio, eres lo mejor que me dejó la maestría.

CONTENIDO

APROBACION	2
APROBACION	3
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	4
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
LISTADO DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Aldehído Deshidrogenasas (ALDHs)	14
2.2 Betaína Aldehído Deshidrogenasas (BADHs)	16
2.2.1 Betaína Aldehído Deshidrogenasa de Riñón de Cerdo (pkBADH)	17
2.2.2 Características Estructurales de BADHs	19
2.2.3 Sitio Activo de la pkBADH	19
2.3 Compuestos Inactivadores de ALDHs y pkBADH	20
2.3.1. Agentes Óxido-Reductores	21
2.3.2 Reactivos Específicos de Grupos Sulfhidrilo	22
2.4 Ciclofosfamida (CTX)	24
2.4.1 Estructura Química, Función y Uso de CTX	24
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo General	28
4.2 Objetivos Particulares	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Sobreexpresión de pkBADH	29
5.2 Purificación de pkBADH	29
5.3 Cuantificación de Proteína	30
5.4 Electroforesis Nativa (PAGE) y SDS-PAGE (Desnaturalizante y Reductora)	30
5.5 Ensayo de Actividad	31
5.6 Efecto de la CTX en la Actividad	31
5.7 Cinéticas de Inactivación por CTX	31
5.8 Efecto de los Sustratos y Productos en la Inactivación de pkBADH por CTX	32
5.9 Reactivación de la pkBADH	32
5.10 Acoplamiento Molecular	33
5.11 Análisis de Datos Experimentales	33

CONTENIDO (Continuación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 Efecto de la CTX Sobre la Actividad de la pkBADH	34
6.2 Efecto Inactivador de la CTX Sobre la pkBADH	35
6.3 Efecto de los Ligandos de la pkBADH en la Inactivación por CTX.....	42
6.4 Reversibilidad de la Inactivación de la pkBADH por CTX.....	46
6.5 Mecanismo Propuesto para la Inactivación de pkBADH por Ciclofosfamida.....	48
7. CONCLUSIÓN	49
8. PERSPECTIVAS	50
9. REFERENCIAS	51

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reacción del DSF con el sitio activo (Tomada de Ayala-Castro <i>et al.</i> , 2007)....	23
2	Estructura de la CTX.....	25
3	Efecto de la ciclofosfamida (CTX) en la actividad de la pkBADH.....	35
4	Cinética de inactivación de pkBADH con concentraciones variables de CTX...	36
5	Electroforesis nativa de la pkBADH en presencia de CTX.....	37
6	Acoplamiento molecular pkBADH – ciclofosfamida.....	39
7	Acoplamiento molecular pkBADH – ciclofosfamida.....	40
8	Acoplamiento molecular pkBADH – Disulfiram.....	41
9	Efecto del NAD ⁺ en la inactivación de la pkBADH con 1 mM de CTX.....	43
10	Efecto del NADH en la inactivación de la pkBADH causada por CTX.....	44
11	Efecto de betaína aldehído en la inactivación de la pkBADH por CTX.....	45
12	Efecto de glicina betaína en la inactivación de la pkBADH provocada por CTX.....	46
13	Efecto de los agentes reductores DTT, β- mercaptoetanol y GSH en la inactivación de la pkBADH.....	47
14	Reacción de CTX por grupos sulfhidrilo presentes en la pkBADH.....	49

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Constante de decaimiento aparente y amplitud.....	36
2	Constante de crecimiento aparente y amplitud.....	47

RESUMEN

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído (BA) a glicina betaína (GB). En células animales, GB funciona como osmoprotector y osmorregulador, además, actúa como donador de grupos metilo en el metabolismo de homocisteína en hígado. La ciclofosfamida (CTX) es un fármaco antineoplásico e inmunosupresor, de metabolismo hepático y excreción renal, que en su estructura posee dos átomos de cloro altamente oxidantes. El objetivo de éste trabajo fue estudiar el efecto de la CTX sobre la actividad de la pKBADH y el mecanismo por el cual la afecta. Para lo anterior se cuantificó la actividad de pKBADH incubando y sin incubar a la enzima con CTX (0.2–2 mM), así como también en presencia de NAD⁺, NADH (10–500 μM), BA (0.1 y 0.4 mM) y GB (10 y 100 mM). Se llevó a cabo electroforesis nativa de la pKBADH en ausencia y presencia de CTX, para determinar el estado oligomérico de la enzima. Se realizó un acoplamiento molecular pKBADH/CTX utilizando el software MOE para conocer las posibles interacciones entre estas. Los ensayos de actividad mostraron una disminución de 19% y 23% de la actividad enzimática con respecto al control (CTX 0 mM). Al incubar a la pKBADH con concentraciones variables de CTX, la actividad enzimática disminuyó 44% y 66% en presencia de CTX 0.2 mM y 2 mM, respectivamente. La disminución en la actividad enzimática no fue por disociación de la enzima ya que la electroforesis nativa mostró que la pKBADH mantuvo su conformación tetramérica al estar en presencia de CTX. Los ensayos de actividad mostraron que el NAD⁺ aumentó la inactivación 28% más que en su ausencia, mientras que el NADH, BA y GB no tuvieron un efecto en el grado de inactivación. La pKBADH se reactivó 96% y 93% con DTT y β-mercaptoetanol (respectivamente), mientras que GSH no reactivó a la enzima. Los resultados del acoplamiento molecular indicaron que la CTX entra al sitio activo y es capaz de interactuar con las cisteínas catalítica y vecinal. La pKBADH es inactivada en concentraciones fisiológicas de CTX, el agente reductor fisiológico GSH no revierte dicha inactivación, lo cual indica que a nivel hepático y renal puede haber consecuencias negativas relacionadas con la disminución de la síntesis de GB, lo cual afectaría las varias funciones en las que se ha involucrado a GB en esos órganos.

Palabras clave: osmoproteccion, osmorregulacion, oxidación, grupos sulfhidrilo, pKBADH.

ABSTRACT

The enzyme Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) catalyzes the irreversible oxidation of betaine aldehyde (BA) to glycine betaine (GB). In animal cells, GB functions as an osmoprotector and osmoregulator, and also acts as a donor of methyl groups in the homocysteine metabolism in the liver. Cyclophosphamide (CTX) is an antineoplastic and immunosuppressive drug, with hepatic metabolism and renal excretion, the CTX in its structure has two highly oxidizing chlorine atoms. The objective of this work was to study the effect of CTX on the activity of pkBADH and its mechanism of action. The activity of pkBADH was quantified incubating and without incubating the enzyme with CTX (0.2-2 mM), as well as in the presence of NAD⁺, NADH (10-500 μ M), BA (0.1 and 0.4 mM) and GB (10 and 100 mM). PkBADH native electrophoresis was carried out in the absence and presence of CTX, the gels were stained with Commasie colloidal. PkBADH/CTX docking was performed using the MOE software. Activity data showed a decrease of 19% and 23% in enzyme activity with respect to the control (0 mM CTX). When incubating pkBADH with varying concentrations of CTX, the enzymatic activity decreased 44% and 66% in the presence of 0.2 mM and 2 mM CTX, respectively. The decrease in the enzymatic activity was not due to dissociation of the enzyme since the native electrophoresis showed that pkBADH maintained its tetrameric conformation in presence of CTX. NAD⁺ increased inactivation 28% more than in its absence, while NADH, BA and GB had no effect on the inactivation degree. PkBADH was reactivated by DTT and β -mercaptoethanol 96% and 93% (respectively), while GSH did not recover the enzyme activity. Docking results indicated that CTX enters to the active site and is able to interact with catalytic and neighborhood cysteine. PkBADH is inactivated in physiological concentrations of CTX, the physiological reducing agent GSH did not reverse this inactivation, which indicates that there may be negative effects at liver and renal level related to the decrease in the synthesis of GB, which would affect the various functions in which GB has been involved in those organs.

Key words: osmoprotection, osmoregulation, oxidation, sulfhydryl group, pkBADH.

1. INTRODUCCIÓN

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo (pkBADH) (BADH EC 1.2.1.8. NAD⁺ oxidoreductasa) cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído (BA) a glicina betaína (GB) (Guzmán-Partida *et al.*, 1998), que es un compuesto cuaternario de amonio, el cual funciona como osmolito y osmoprotector. Por otra parte, GB puede donar grupos metilo en el ciclo homocisteína/metionina, así como para la represión o expresión de factores de transcripción relacionados con el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas (Diamant *et al.*, 2001; Umeneshi *et al.*, 2005; Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2010; Figueroa-soto y Valenzuela-Soto *et al.*, 2018). Esta enzima en mamíferos se localiza en mitocondria y citosol predominando la forma citosólica, y se encuentra en diversos órganos como riñón e hígado, así como en glóbulos rojos y cerebro. (Chern y Pietruszko, 1995).

La ciclofosfamida (CTX) es un fármaco antineoplásico e inmunosupresor utilizado en enfermedades mieloproliferativas, sarcomas y lupus eritematoso sistémico (Montegudo *et al.*, 2005; Macías-García, 2008). Este fármaco se metaboliza en el hígado y se excreta por riñón, y se ha demostrado que sólo se metaboliza el 75% de la CTX (Montegudo *et al.*, 2005). La CTX posee dos átomos de cloro en su estructura química los cuales son altamente electronegativos y tienen la capacidad de reducir la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas. Además, estos átomos de cloro de la CTX tienen afinidad por los grupos sulfhidrilo de compuestos antioxidantes como el glutatión y proteínas, a los cuales oxida (Stankiewicz *et al.*, 2002).

La pkBADH posee en su estructura primaria 64 grupos sulfhidrilo en el homotetrámero, cada monómero posee una cisteína catalítica y una vecinal, lo cual sugiere que esta enzima puede ser blanco de la CTX. Por lo que en este estudio se analizó el efecto de la CTX sobre la actividad de la pkBADH y el mecanismo de dicha inactivación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aldehído Deshidrogenasas (ALDHs)

La superfamilia de Aldehído deshidrogenasas (ALDHs) está formada por enzimas NAD (P)⁺ dependientes, las cuales catalizan la oxidación de aldehídos tanto de origen endógeno como exógeno a sus respectivos ácidos carboxílicos. Las ALDHs son enzimas que presentan actividad de esterasa y reductasa, y presentan un amplio espectro de actividades biológicas (Koppaka *et al.*, 2012; Vasiliou *et al.*, 2013). Además, poseen funciones como: detoxificación de xenobióticos, actividad antioxidante directamente en la generación de GSH o indirectamente generando NAD(P)H, formando parte de la estructura de la córnea y cristalino contribuyendo con la transparencia, asimismo, tienen propiedades de vasorelajación debido a que pueden sintetizar nitroglicerina (Vasiliou y Nebert, 2005; Jackson, 2015).

La superfamilia de ALDHs consiste en 24 familias de origen eucariota y 3 familias de origen procariota que corresponden a las familias 25, 26 y 27. Por lo general, los miembros de la familia comparten más del 40% de identidad y los miembros de la subfamilia comparten más del 60% de identidad, la homología no se toma en cuenta para agrupar a las familias (Vasiliou y Nebert, 2005; Vasiliou *et al.*, 2013; Jackson, 2015).

Las ALDHs son proteínas mutiméricas que están compuestas por monómeros de aproximadamente 500 aminoácidos, donde cada monómero contiene tres dominios estructurales: un dominio catalítico, un dominio de unión a la coenzima NAD(P)⁺, y un dominio de oligomerización, estructuralmente activas se pueden encontrar típicamente como homodímeros u homotetrámeros (Steinmetz *et al.*, 1997; Jackson, 2015).

Las familias de ALDHs tienen diferentes funciones metabólicas, por ejemplo, las ALDH1 participan en la biosíntesis de ácido retinoico a partir de retinaldehído, y la ALDH2 participa en el metabolismo del alcohol, en la conversión de acetaldehído a acetato. Las ALDH3 participan en la oxidación de aldehídos alifáticos de cadena mediana y larga, y aldehídos aromáticos, además son enzimas que están relacionadas con la peroxidación de lípidos. La ALDH5, o también conocida como succinil semialdehído deshidrogenasa, participa en el último paso del catabolismo del ácido

γ -aminobutírico (GABA), en la conversión de succinil semialdehído a succinato. Las ALDH7 en humanos tienen un papel principal en el catabolismo de lisina, en la oxidación del α -aminoadípico semialdehído (AASA) a alfa-aminoadipato.

Las ALDH9 son enzimas que participan en el metabolismo de γ -aminobutiraldehído y aminoaldehídos derivados de poliaminas, también conocidas como betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs) o aminoaldehído deshidrogenasas (AMADH). Las ALDH10 son BADHs encontradas en plantas y catalizan la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína, su estado de oligomerización activo es el dímero, a diferencia de las BADHs de mamíferos (ALDH9) en las cuales la estructura activa de la enzima es el tetramero (Vasiliou y Nebert, 2005; Vasiliou *et al.*, 2013).

2.1.1 Aldehído Deshidrogenasas Clase 9 (ALDH9)

Las ALDH9 se localizan en las células de mamíferos, encontrándose en mayor proporción en órganos como cerebro, hígado y riñón (Lin *et al.*, 1996). Las enzimas pertenecientes a esta familia, se localizan tanto en el citosol como en mitocondria, la forma citosólica es la que se encuentra en mayor proporción en las células (Chern y Pietruszko, 1999).

Las ALDH9 participan en diversas rutas metabólicas, por ejemplo, en el metabolismo de γ -aminobutiraldehído que está relacionado con la biosíntesis de ácido aminogammabutírico (GABA), en el metabolismo de la dopamina, en la síntesis de glicina betaína, en la biosíntesis de carnitina y acetaldehído. Además, estas enzimas participan en el catabolismo de poliaminas, colina y arginina (Marchitti *et al.*, 2008; Rosas-Rodríguez *et al.*, 2010; Riveros-Rosas *et al.*, 2013).

Las ALDH9, junto a las ALDH10, 25, 26 y 27 tienen actividad de aminoaldehído deshidrogenasa (AMADH) por lo cual, a éstas últimas se les llama también betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs). La capacidad de estas enzimas de participar en diversas rutas metabólicas, se debe a que las AMADHs poseen en su sitio activo residuos aromáticos como triptófano, fenilalanina y tirosina, que les confieren la capacidad de interactuar con diferentes aminoaldehídos. Mediante herramientas bioinformáticas, se demostró que estos residuos aromáticos son muy conservados en las enzimas AMADHs (Riveros-Rosas *et al.*, 2013). Las BADHs oxidan, con diferente grado de

eficiencia catalítica, aldehídos de cadena corta que poseen en su estructura el grupo cuaternario trimetilamonio, como betaína aldehído (BA) y 4-trimetilbutiraldehído (TMABAL) y, además, oxidan los grupos amino primarios de 3-propionaldehído (APAL) y 4-aminobutiraldehído (ABAL) (Riveros-Rosas *et al.*, 2013).

2.2 Betaína Aldehído Deshidrogenasas (BADHs)

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH E.C. 1.2.1.8. NAD⁺/NADP⁺ oxidoreductasa) cataliza la reacción de oxidación irreversible de betaína aldehído a glicina betaína (GB). Esta enzima juega un papel importante en diferentes organismos bajo condiciones de estrés hídrico y/u oxidativo, y el producto GB es un compuesto cuaternario de amonio que actúa como osmorregulador y osmoprotector (Guzmán-Partida *et al.*, 1998; Diamant *et al.*, 2001; Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008; Rosas-Rodríguez *et al.*, 2010).

Las BADHs presentan diferencias en la preferencia por la coenzima, por ejemplo: las BADHs de plantas, mamíferos y algunas bacterias tienen mayor preferencia por NAD⁺, por otro lado, la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* puede utilizar tanto NAD⁺ como NADP⁺ (Falkenberg y Storm, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Dragolovich y Pierce, 1994; Guzmán-Partida *et al.*, 1998; Velasco-García *et al.*, 1999; González-Segura *et al.*, 2008). La forma activa de las BADHs depende del organismo, por ejemplo, en mamíferos la BADH es un tetrámero, en plantas es dímero, y en bacterias se puede encontrar como dímero o tetrámero dependiendo de la especie. Las BADHs comparten similitudes estructurales entre ellas, como son los 3 dominios que poseen: 1) dominio de oligomerización, 2) dominio de unión a la coenzima y 3) dominio de unión a sustrato aldehído; en este último dominio se encuentra la cisteína catalítica, la cual es muy conservada en BADHs (Johansson *et al.*, 1998; González-Segura *et al.*, 2009; Halavaty *et al.* 2015).

Las BADHs estudiadas poseen en su secuencia de aminoácidos una cisteína muy conservada en el sitio activo, la cual une al sustrato aldehído y es la encargada de llevar a cabo la catálisis. En la BADH de *P. aeruginosa* la cisteína se encuentra en la posición 286, mientras que, en la BADH de amaranto, la cisteína está en la posición 294 (González-Segura *et al.*, 2009; Muñoz-Clares *et al.*, 2011). La BADH de riñón de cerdo (pkBADH) presenta dos cisteínas vecinales en el sitio activo,

la posición 288 corresponde a la cisteína catalítica y la 289 a la cisteína vecinal (Rosas-Rodríguez *et al.*, 2011). Se ha propuesto que la función de las cisteínas vecinales en algunas ALDHs y BADHs es la de formar puentes disulfuro entre sí bajo condiciones de estrés oxidativo y de esta forma evitar la oxidación irreversible de la cisteína catalítica (Muñoz-Clares *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en el sitio activo de las BADHs se han encontrado residuos conservados de ácido glutámico, el cual participa en la polarización del grupo carbonilo del sustrato aldehído y estabiliza los intermediarios de la reacción (Muñoz-Clares *et al.*, 2010). Los residuos relacionados con el dominio de unión a la coenzima, como lisina, glicina, ácido glutámico, triptófano y fenilalanina se encuentran muy conservados en las BADHs, debido a que la enzima es dependiente de la coenzima para la accesibilidad del sustrato aldehído (González-Segura *et al.*, 2009).

Algunas BADHs requieren de cationes monovalentes que proporcionen fuerza iónica para su actividad, los cuales afectan sus constantes cinéticas y/o tiene un papel en el estado de oligomerización de estas enzimas. Los iones potasio y amonio actúan incrementando la actividad enzimática en la pkBADH (Guzmán-Partida *et al.*, 1998). Los iones sodio y litio actúan incrementando la actividad, pero en menor escala, o pueden inhibir algunas de estas enzimas; como es el caso del sodio en la pkBADH que disminuye su actividad (Guzmán-Partida *et al.*, 1998; Ayala-Castro *et al.*, 2017). Las BADHs de *Escherichia coli* (Falkenberg y Storm, 1990), amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997) son activadas por el ion potasio. La BADH de *P. aeruginosa* estrictamente requiere de iones potasio para mantener su conformación activa (Velasco-García *et al.*, 1999). Mientras que la pkBADH requiere de cationes monovalentes para mantener su conformación activa y, además le proporciona termoestabilidad (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003; Valenzuela-Soto *et al.*, 2005).

2.2.1 Betaína Aldehído Deshidrogenasa de Riñón de Cerdo (pkBADH)

La pkBADH sigue un mecanismo cinético secuencial iso bi-bi ordenado, donde el primer sustrato que se une a la enzima es NAD⁺, posteriormente se une betaína aldehído para formar el complejo ternario requerido para la catálisis, el primer producto liberado es glicina betaína y el último es el NADH (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Mediante ensayos de inmunolocalización se encontró que la pkBADH se localiza en la médula y corteza renal, y se ha propuesto que su localización celular posiblemente sea citoplasmática (Figueroa-Soto *et al.*, 1999). La pkBADH en su estado de oligomerización activo es un homotetrámero, cada subunidad del tetrámero tiene una masa molecular de aproximadamente 54 kDa (Guzmán-Partida *et al.*, 1998). Esta enzima requiere de fuerza iónica para mantener su conformación tetrámérica activa, debido a que a baja fuerza iónica se disocia en dímeros inactivos muy estables (Valenzuela-Soto *et al.*, 2005). La enzima pkBADH requiere de fuerza iónica otorgada por un catión monovalente como el potasio para su termoestabilidad (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003).

La pkBADH, al ser una ALDH9, presenta actividad de AMADH. La capacidad de utilizar diferentes aminoaldehídos está relacionada con la presencia de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina en el sitio activo, los cuales han sido identificados en las diferentes AMADHs. Estos residuos tienen en su estructura anillos aromáticos y se encuentran localizados en el dominio de unión a betaína aldehído, por lo que, al conjunto se le denomina “caja aromática”. Los residuos aromáticos le otorgan una carga electrostática negativa a la superficie potencial en el sitio de entrada del aldehído, esto gracias a los grupos carboxilo de la cadena principal. Los aminoácidos de la “caja aromática” interactúan con el catión- π de grupos amino primarios aminopropionaldehído y aminobutiraldehído (APAL y ABAL) y con los grupos trimetilamonio de betaína aldehído y trimetilaminobutiraldehído (BA y TMABAL) (Riveros-Rosas *et al.*, 2013).

Mediante la modelación *in silico* de la BADH del camarón blanco se ha encontrado la presencia de tres residuos aromáticos en el sitio de unión al aldehído que corresponden a fenilalanina 168, triptófano 175 y fenilalanina 466 (Delgado-Gaytán *et al.*, 2017). En la BADH de *P. aeruginosa* se han encontrado 3 residuos aromáticos en el sitio de unión al aldehído, triptófano 161, tirosina 154 y fenilalanina 296 además de un residuo alifático como valina (Riveros-Rosas *et al.*, 2013). Según el modelo presentado por Rosas-Rodríguez, (2010), en el sitio de unión a betaína aldehído se encuentran dos residuos aromáticos que son el triptófano 165, la tirosina 158 que le permiten a la pkBADH catalizar diferentes aminoaldehídos.

2.2.2 Características Estructurales de BADHs

Las BADHs de hígado de bacalao, y de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*, ya se encuentran cristalizadas y difractadas por espectroscopia de rayos X, y se ha encontrado que presentan un plegamiento tipo Rossmann característico de la ALDHs: conformadas por el dominio de unión a la coenzima, el dominio de oligomerización y el dominio de unión a sustrato (González-Segura *et al.*, 2009; Halavaty *et al.*, 2015; Koncitiková *et al.*, 2019).

En plantas como amaranto y avena, la BADH presenta una conformación activa dimérica (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Livingstone *et al.*, 2003). Las BADHs de microorganismos como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* presentan conformación tetrámérica (Falkenberg y Storm, 1990; Boch *et al.*, 1997; Velasco-García *et al.*, 1999).

En la BADH de hígado de bacalao, el dominio catalítico está formado por 6 láminas β paralelas, mientras que el de oligomerización es una extensión del dominio de unión a la coenzima formado por tres láminas β antiparalelas (Johansson *et al.*, 1998). En la BADH recombinante de *Ammopiptanthus nanus*, la estructura secundaria predicha es de un 41.4% de α hélices, un 7.6% de β plegadas y un 34.19% de arreglos al azar (Yu *et al.*, 2014). La estructura secundaria para la BADH de *S. aureus* es 40% α -hélice, 19% láminas β y 41% de arreglos al azar (Halavaty *et al.*, 2015). La estructura secundaria de la BADH *P. aeruginosa* es de 41% α -hélice, 21 % de láminas β -plegadas y 38% de arreglos al azar (González-Segura *et al.*, 2009). Mediante la modelación *in silico*, se ha encontrado que la pkBADH presenta los dominios característicos de las BADHs mencionados anteriormente; además, estudios de dicroísmo circular de la pkBADH mostraron que ésta posee en su estructura secundaria 42% de α -hélices, 20.5% de láminas β -plegadas y 37.5% de arreglos al azar (Muñoz-Bacasehua *et al.* manuscrito en revisión).

2.2.3 Sitio Activo de la pkBADH

Mediante estudios de modelación *in silico* se creó un modelo para la pkBADH, utilizando como molde la BADH de hígado de bacalao que presentó un 69% de identidad con respecto a la

pkBADH. Utilizando la herramienta bioinformática MOE (Molecular Operating Environment) se realizó un acoplamiento molecular, donde se observa que el sustrato aldehído se une a la cisteína 288 que es la responsable de la catálisis. Además, el modelo muestra los residuos aromáticos y alifáticos relacionados con la “caja aromática”, los cuales corresponden a la tirosina 158, el triptófano 165 y el residuo alifático valina 287. El modelo también muestra que los residuos involucrados en la unión de la coenzima son serina 233, los glutámicos 254 y 351, los triptófanos 156 y 165, la lisina 180 y glicina 154 (Rosas-Rodríguez, 2010).

La presencia de la cisteína altamente conservada en ALDHs y BADHs ha dado lugar a diversos estudios, en los cuales se han utilizado reactivos específicos para modificar el grupo sulfhídrido del aminoácido, alterando procesos metabólicos donde la enzima está implicada (Koppaka *et al.*, 2012). Entre los reactivos específicos para la modificación de cisteínas en las ALDHs se han estudiado el metilmetanotiosulfonato (MMTS), yodoacetamida, molinato y disulfiram (DSF) (Velasco-García *et al.*, 2003; Ayala-Castro *et al.*, 2007; Allen *et al.*, 2010).

2.3 Compuestos Inactivadores de ALDHs y pkBADH

Los inactivadores de ALDHs se han ido descubriendo debido a los efectos colaterales que presentan muchos fármacos y compuestos utilizados en el área clínica. El blanco de los inactivadores en estas enzimas radica en su cisteína catalítica, la cual es muy conservada. Se han desarrollado inactivadores para 3 isoenzimas de ALDHs que están relacionadas con el metabolismo del etanol (ALDH2) y con el metabolismo de aldehídos de cadena media a larga, además de aldehídos aromáticos (ALDH1 y ALDH3) (Koppaka *et al.*, 2012).

En el desarrollo de inactivadores de ALDH surgen efectos adversos debido al blanco al que se dirigen, un ejemplo es el fármaco disulfiram (DSF), utilizado en el alcoholismo crónico, esta molécula inactiva a la acetaldehído deshidrogenasa oxidando a la cisteína catalítica. Sin embargo, el disulfiram oxida todos los grupos sulfhídrido con los que interactúa, incluyendo a los de otras enzimas, surgiendo los efectos secundarios de la administración del fármaco (Lipski *et al.*, 2001; Koppaka *et al.*, 2012). Además de los fármacos o inactivadores específicos, existen diversos compuestos que se originan en el propio organismo bajo diferentes tipos de estrés, capaces de

inactivar a las BADHs como es el caso del peróxido de hidrógeno que se origina por un desequilibrio entre la cantidad de agentes reductores y agentes oxidantes: también, algunos metales de transición actúan como inactivadores por su capacidad REDOX (Ruiz-López *et al.*, 2006; Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011; Rosas-Rodríguez *et al.*, 2012).

2.3.1. Agentes Óxido-Reductores

Los inactivadores de ALDHs son muy diversos, entre ellos se encuentran los iones metálicos como, cobre, cadmio y manganeso y otros metales de transición, además de las especies reactivas de oxígeno (ERO) quienes tienen la capacidad de inactivar proteínas, ya que pueden provocar cambios en la estructura terciaria o porque se unen a los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Giles *et al.*, 2003; Ruiz-López *et al.*, 2006; Rosas-Rodríguez *et al.*, 2011).

Estudios con ratas tratadas con altas dosis de manganeso mostraron que los animales desarrollaron enfermedad renal severa, donde se observó una osmorregulación deficiente, esto podría deberse a la disminución de la actividad de BADH y, por ende, una disminución en los niveles de GB que actúa como osmorregulador en las células renales (Huang y Lin, 2006). También, se ha demostrado que el manganeso inactivó a la BADH provocando cambios en la estructura terciaria (Ruiz-López *et al.*, 2006). El ion cobre tienen una gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de las BADHs, oxidándolos directamente y provocando la inactivación enzimática o induciendo cambios conformacionales en ellas (Rosas-Rodríguez *et al.*, 2012).

Estudios de Rosas-Rodríguez y colaboradores (2011) demostraron que el cobre inactiva a la pKBADH. Estos autores proponen dos mecanismos para explicar dicha inactivación: uno donde el cobre interactúa tanto con la cisteína catalítica como con la vecinal, y otro donde el cobre induce la formación de un puente disulfuro entre cisteínas vecinales, además, el cobre al ser un metal de transición genera, especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno (Giles *et al.*, 2003; Rosas-Rodríguez *et al.*, 2011).

Existen varias fuentes de generación de EROs en el riñón: 1) la hiperosmolaridad a la que se encuentran las células de la médula renal, 2) la actividad de la NADH oxidasa y 3) la cadena respiratoria mitocondrial (Banday y Lokhandwala, 2011). Las EROs se han implicado en una gran

variedad de enfermedades tales como glomerulonefritis, insuficiencia renal, proteinuria, Alzheimer, diabetes e hipertensión 1 (Vaziri, 2004; Martin y Goeddeke-Merickel, 2005; Banday y Lokhandwala, 2011).

Otra fuente de generación de EROs son los iones metálicos como fierro, cadmio y cobre los cuales tienen la capacidad de generar estrés oxidativo (Bonda *et al.*, 2011). Las EROs afectan a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, en proteínas interactúan cambiando la torsión en los residuos de aminoácidos provocando cambios conformacionales (Alvarez *et al.*, 2010). En las células renales las EROs más abundantes son el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este se forma por la reducción del oxígeno del agua (H_2O), y es muy importante debido a que puede generar el radical hidroxilo (OH^-) (Rosas-Rodríguez *et al.*, 2011).

La pkBADH presenta cambios en su estructura terciaria y en la oxidación de su cisteína catalítica en presencia de peróxido de hidrógeno a concentraciones fisiológicas (100 mM) en la médula renal, lo que provocaría una disminución en la actividad de la enzima, y un impacto negativo en la osmorregulación a nivel renal (Rosas-Rodríguez *et al.*, 2011).

2.3.2 Reactivos Específicos de Grupos Sulfhidrilo

El DSF es un fármaco utilizado en el tratamiento del alcoholismo crónico, es el inhibidor más conocido de las ALDHs. El DSF tiene como blanco a la ALDH2 inactivándola irreversiblemente, el efecto de esta inactivación es la acumulación de acetaldehído después de ingerir alcohol, provocando efectos adversos conocidos como efecto “antabuse” o al disulfiram (Kitson, 1977). El DSF es un reactivo específico de grupos tiol, este puede formar puentes disulfuro tanto intercatenarios como intracatenarios cuando se encuentran dos cisteínas vecinales, pero este fármaco no solo inactiva a las ALDH2, sino a todas las ALDH por la cisteína catalítica que presentan en su sitio activo (Lipski *et al.*, 2001; Koppaka *et al.*, 2012).

La pkBADH es inactivada por el DSF, los estudios de Ayala-Castro *et al.* (2007) muestran que el DSF provoca la formación de un puente disulfuro entre el DSF y la enzima o la formación de un puente disulfuro entre cisteínas vecinales como se observa en la Figura 1. La inactivación provocada por DSF fue revertida con glutatión al igual que la BADH de *P. aeruginosa*, lo que

indica que bajo condiciones fisiológicas el glutatión no podría revertir la inactivación, lo cual provocaría deficiencia en la osmorregulación renal (Velasco-García *et al.*, 2003; Ayala-Castro *et al.*, 2007).

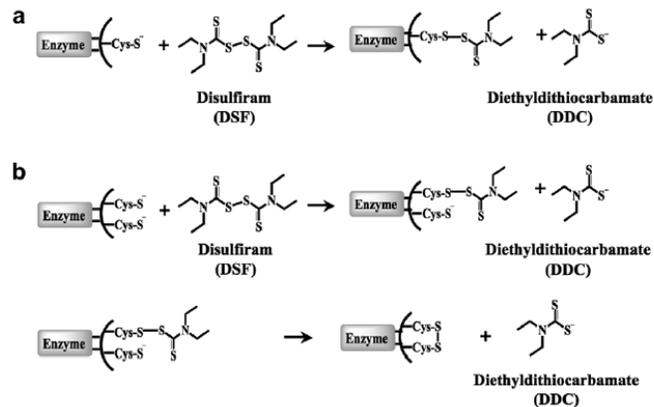


Figura 1. Reacción del DSF con el sitio activo de pkBADH. (a) Formación de un disulfuro mixto y (b) formación de puente disulfuro intermolecular (Tomada de Ayala-Castro *et al.*, 2007).

Otro agente químico que es un reactivo de grupos sulfhidrilo es el metilmetanetiosulfonato (MMTS), el cual inactiva a la PaBADH por medio de la oxidación de la cisteína catalítica 286 (González-Segura *et al.*, 2002).

Estos compuestos químicos son efectivos para tratamientos de diversas enfermedades, como es el caso del DSF para el alcoholismo crónico, pero al suministrar el fármaco también se presentan efectos colaterales a nivel hepático y renal. Otro fármaco que podría inactivar a las ALDHs es la ciclofosfamida, este es fármaco utilizado en neoplasias y enfermedades autoinmunes, pero su administración desencadena problemas a nivel hepático y renal, ya que por sus características químicas generar estrés oxidativo.

2.4 Ciclofosfamida (CTX)

La ciclofosfamida es un fármaco antineoplásico, es un agente alquilante utilizado en diversos esquemas terapéuticos de enfermedades oncológicas y reumatológicas. La CTX ha mostrado que tiene la capacidad de disminuir la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa), además de favorecer la formación de ERO's, que tienen la capacidad de inactivar a ALDHs (Stankiewicz *et al.*, 2002).

2.4.1 Estructura Química, Función y Uso de CTX

La CTX es un fármaco que se metaboliza en el hígado y se excreta por orina a través del riñón, este debe ser bioactivado a nivel hepático para ser funcional (Modal *et al.*, 2005). La CTX en su estructura contiene dos átomos de cloro muy electronegativos (Figura 2). La ciclofosfamida actúa generando entrecruzamiento entre el ADN y el fármaco, esta reacción con el ADN se da preferentemente en la posición N-7 de la guanina, provocando la pérdida de purina o desdoblamiento de la misma y finalmente ruptura y fragmentación de la cadena de ADN (Monteagudo *et al.*, 2005; Macías-García, 2008). Se ha visto que, del total de dosis suministrada de CTX, se metaboliza entre un 70-75% en el hígado, el resto se elimina por vía renal y se ha encontrado que entre 25-30% es excretado sin ser bioactivado, tal y como se suministra (Omdal *et al.*, 1993).

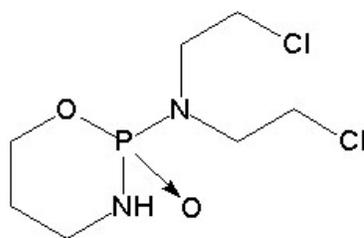


Figura 2. Estructura química de la ciclofosfamida.

La CTX es utilizada en altas dosis las cuales son mayores a 50 mg/Kg/día (Lee *et al.*, 2010). Los efectos adversos descritos de CTX son: cistitis hemorrágica (nefrotoxicidad), hepatotoxicidad, mielosupresión e hiponatremia entre otros (Bonella *et al.* 2017; Ahmed *et al.*, 2018). Se han descrito dos mecanismos para que la CTX cause cistitis hemorrágica: un mecanismo donde hay una secreción inadecuada de hormona antidiurética (ADH) y otro donde la ciclofosfamida compete con la ADH incrementando la permeabilidad del agua en el túbulo distal (Bruining *et al.*, 2011; Gilbar *et al.*, 2012). En un estudio llevado a cabo por Bonella y colaboradores (2017) se encontró que altas dosis (50 mg/kg/día) de CTX inducían hiponatremia en pacientes que previamente habían recibido bajas dosis del fármaco.

La mayoría de los estudios con CTX están relacionados sobre cómo mitigar los efectos tóxicos producidos por el fármaco, en diversos estudios se demuestra el efecto tanto nefrotóxico, como hepatotóxico inducido por la CTX (Song *et al.*, 2014; Cuce *et al.*, 2014; Ahmed, 2018). En un estudio donde la CTX indujo cistitis renal, se analizó el efecto antioxidante del ácido lipoico y mesna (β -mercaptoetanoato de sodio), y se encontró que la combinación del ácido lipoico y mesna disminuyeron significativamente la cistitis hemorrágica (Song *et al.*, 2013).

En otro estudio se evaluó el efecto de la vitamina E en la hepatotoxicidad inducida por CTX. Se encontraron cambios histológicos en las células hepáticas provocados por el fármaco, pero las células tratadas con vitamina E no presentaron cambios morfológicos (Cuce *et al.*, 2015). Un estudio realizado por Ahmed (2018) demostró que CTX provoca cambios histológicos en células hepáticas, pero estos cambios pueden ser inhibidos por el ajo negro, además éste reduce el estrés oxidativo generado por la CTX (Ahmed, 2018). Por otra parte, ratas a las que se les indujo toxicidad en testículos con CTX mostraron reducción en los niveles de testosterona y anomalías morfológicas en espermatozoides; la suplementación con ácido gálico (GA) a dichas ratas disminuyó el daño tóxico inducido por el fármaco (Oyagbemi *et al.*, 2015).

Stankiewicz y colaboradores (2002), demostraron que la CTX provoca estrés oxidativo en hígado, debido a que el fármaco disminuye la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas, además de elevar los niveles de acroleína y 4-hidroxineonal y disminuir los niveles de glutatión. La administración de la amifostina incrementó los niveles de antioxidantes no enzimáticos, resultando en un incremento total en el estatus antioxidante (Stankiewicz *et al.*, 2002).

Con base a una profunda revisión bibliográfica se puede concluir que no hay estudios específicos del efecto de la CTX sobre la actividad de enzimas, solo hay reportes de que el fármaco induce

nefrotoxicidad y/o hepatotoxicidad, además de generar estrés oxidativo y alteraciones histológicas. Los estudios de los efectos secundarios de la CTX están centrados en buscar nuevos compuestos que los disminuyan.

Las células de la médula renal se adaptan a su medio ambiente hipertónico y con altas concentraciones de urea mediante la síntesis y acumulación de GB, glicerofosfocolina, inositol y sorbitol y de esta manera contrarrestan ese medio ambiente adverso generado por el proceso de formación de orina (Beck *et al.*, 1990; Burg *et al.*, 2008). GB es un osmolito importante en las células hepáticas y renales debido a que se ha demostrado que puede disminuir el estrés oxidativo, además puede interactuar con las proteínas CLpB y DNK las cuales actúan como chaperonas (Diamant *et al.*, 2001). GB interacciona con el promotor de las aquaporinas P1 (AQP1) bajo condiciones de estrés hipertónico aumentando su expresión (Go *et al.*, 2005; Umeneshi *et al.*, 2005). Por todo lo anteriormente expuesto, se propone que la pK_{BADH} al poseer una cisteína involucrada en la catálisis puede ser afectada por la ciclofosfamida ya sea inhibiéndola y/o inactivándola, lo que podría ser perjudicial a nivel hepático y renal.

3. HIPÓTESIS

La ciclofosfamida inactiva a la betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo (pkBADH) a través de la oxidación de la cisteína catalítica o provocando la formación de un puente disulfuro con la cisteína catalítica o con la vecinal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar el mecanismo por el cual la ciclofosfamida inactiva a la betaína aldehído deshidrogenasa de riñón porcino (pkBADH).

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de la CTX en la actividad de pkBADH
- Estudiar el efecto inactivador de la CTX sobre la pkBADH
- Evaluar la reversibilidad de la inactivación de pkBADH-CTX
- Analizar el efecto de los ligandos en la interacción de pkBADH-CTX

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sobreexpresión de pkBADH

La pkBADH se sobreexpresó en células *E. coli* ER2566 transformadas con el plásmido de sobreexpresión pTXB-pkBADH (las células se otorgaron ya transformadas con el constructo pkBADH y las condiciones del Sistema Impact) en medio LB con 50 µg/ml de ampicilina a 37°C, con agitación constante de 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. La sobreexpresión de la proteína se indujo a una concentración de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de 0.4 mM durante 4 h (Muñoz-Bacasehua, 2017).

Las células transformadas e inducidas, fueron recuperadas por centrifugación a 8000 rpm a 4°C por 10 min (Thermo Scientific SL 16R). Las células precipitadas (pellet bacteriano) se resuspendieron en 30 mL de buffer B (HEPES-KOH 20 mM, pH 7.9 KCl 0.5 M, Tritón X-100 0.1%, PMSF 1 mM), y se llevó a sonicación a 30 pulsos discontinuos por 3 min a 4°C (700 Watts, 20 kHz) con un ultrasonicador (Qsónica Sonicators). Posteriormente, el lisado se centrifugó a 8000 rpm a 4°C por 8 min, se tomaron alícuotas del lisado, sobrenadante y precipitado re-suspendido para la cuantificación de proteína, actividad y para el análisis electroforético (Muñoz-Bacasehua, 2017).

5.2 Purificación de pkBADH

La enzima se purificó por cromatografía de afinidad a quitina (Sistema Impact), en el cual la pkBADH está unida a una proteína la cual posee un dominio de unión a quitina, se utilizó una columna empacada con 5 mL de matriz de quitina (New England Biolabs), en un equipo de cromatografía FPLC (Pharmacia). La columna se equilibró con el buffer columna HEPES-KOH 20 mM, pH 8, con KCl 0.5 M, Tritón X-100 0.1% y PMSF 1 mM (buffer A), se aplicaron 10 volúmenes de columna (50 mL), a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se inyectaron a la columna

30 mL del sobrenadante filtrado previamente, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y la proteína no unida se eluyó con 20 volúmenes de columna (100 mL) de buffer A, a una velocidad de flujo de 2 mL/min.

Para separar a pkBADH de la proteína de fusión unida a quitina, se adicionó buffer A con DTT 50 mM, se aplicaron tres volúmenes de columna (15 mL) a una velocidad de flujo de 1 mL/min y se incubó por 18 h a 23 °C. Finalmente, se eluyó a la pkBADH con 25 mL de buffer A con una velocidad de flujo de 1 mL/min, y se colectaron fracciones de 5 mL (Muñoz-Bacasehua, 2017). La enzima se dializó con buffer Hepes 10 mM, pH 8.0, 150 mM de KCl, 15% de glicerol y 14 mM de β -mercaptoetanol con centricones (Amicon) de 30 kDa.

5.3 Cuantificación de Proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) siguiendo el protocolo del kit (Quick Star Bradford proteína assay, BIO-RAD), y se utilizó una curva de albúmina de suero bovino (BSA) como referencia.

5.4 Electroforesis Nativa (PAGE) y SDS-PAGE (Desnaturalizante y Reductora)

Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando el protocolo establecido por Laemmli (1970) en una cámara Mini-PROTEAN III (BIORAD), y al término de las corridas electroforéticas los geles se tiñeron con Coomassie coloidal para su análisis. Se utilizaron geles de acrilamida al 10% para la electroforesis nativa, y al 12% para el SDS-PAGE.

5.5 Ensayo de Actividad

La actividad de la pkBADH se midió espectrofotométricamente siguiendo la reducción de NAD^+ a 340 nm por 3 min en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary-Varian 50). El ensayo de actividad se llevó a cabo en buffer HEPES-KOH 0.1 M, pH 8.0, EDTA 1 mM, NAD^+ 1 mM, BA 0.5 mM y β -mercaptoetanol 14 mM. En un volumen final de cubeta de 400 μL , incluyendo 16 μL de la pkBADH. Cada medición de actividad se realizó por triplicado (Guzmán-Partida *et al.*, 1998).

5.6 Efecto de la CTX en la actividad

La actividad de la enzima se determinó añadiendo al ensayo de actividad CTX 0.4 mM ó 1 mM utilizando el ensayo anteriormente descrito. Cada medición se realizó por triplicado y los datos se expresaron en porcentaje.

5.7 Cinéticas de inactivación por CTX

La pkBADH se dializó con buffer HEPES-KOH 10 mM, pH 7.0, para eliminar el agente reductor. La enzima se mantuvo en una atmosfera de nitrógeno gaseoso para todo el experimental con CTX. La enzima se incubó durante 120 minutos con concentraciones de CTX de 0, 0.2, 0.6, 1, 1.5 o 2 mM, se tomaron alícuotas durante un intervalo de 2 h (cada 15 min en la primera hora y cada 30 en la segunda) y se evaluó la actividad con el método anteriormente descrito. Los datos de actividad se analizaron por regresión no lineal utilizando la ecuación de decaimiento exponencial sencillo (Ecuación 1). Se realizaron triplicados de cada medición y se expresaron en porcentaje.

$$(1) \quad y = y_0 + A_0 e^{-x/t}$$

Donde:

y= actividad en un cierto tiempo

y₀= actividad inicial

A₀= amplitud al tiempo 0

x= concentración de CTX

t = constante de velocidad aparente de decaimiento

5.8 Efecto de los Sustratos y Productos en la Inactivación de pkBADH por CTX

Se incubó a la pkBADH en una atmósfera de nitrógeno con 1 mM de CTX, y con concentraciones de NAD⁺ y NADH entre 10 y 500 μM por 120 minutos; se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min y se evaluó la actividad con el método anteriormente descrito. Los datos se ajustaron a la ecuación de decaimiento exponencial sencillo (Ecuación 1). Se realizaron triplicado de cada medición y los datos se expresaron en porcentaje.

Para analizar el efecto del sustrato BA y el producto GB, se incubó a la pkBADH con BA o con GB 0.05 y 0.5 mM durante 120 minutos, se tomaron alícuotas al tiempo 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min y se evaluó la actividad con el método ya descrito. Los datos se ajustaron a la ecuación que describió su comportamiento (Ecuación 1). Se realizaron triplicado de cada medición y los datos se expresaron en porcentaje.

5.9 Reactivación de la PkBADH

La pkBADH inactivada con CTX 1 mM se incubó con los agentes reductores dithiothreitol (DTT), glutatión (GSH) y β-mercaptoetanol todos a una concentración de 10 mM. Se tomaron alícuotas los tiempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 1440 min, y se evaluó la actividad usando el ensayo de actividad previamente descrito (Guzmán-Partida *et al* 1998). Los datos de actividad se

analizaron por regresión no lineal utilizando la ecuación de crecimiento exponencial sencillo (Ecuación 2). Se realizaron triplicado de cada medición y los datos se expresaron en porcentaje.

$$(2) \quad y = y_0 + Ae^{(x-x_0)/t}$$

Donde:

y= actividad en un cierto tiempo

y₀= actividad inicial

A= amplitud

x-x₀= concentración en un tiempo determinado respecto al inicial

t₁ = constante de velocidad aparente de crecimiento

5.10 Acoplamiento molecular

Para el acoplamiento molecular se utilizó el software MOE V2018.10 (Chemical Computing Group). Se descargó del PubChem la estructura química de la CTX, y se creó un modelo estructural de la pkBADH utilizando como templado la BADH de hígado de bacalao (PDB: 1BPW) y la secuencia primaria de aminoácidos de la pkBADH; una vez generado el modelo se realizó el acoplamiento y se eligieron los modelos más espontáneos, más reproducibles y que interaccionaran con la cisteína catalítica 288, todo lo anterior se realizó en el MOE.

5.11 Análisis de Datos Experimentales

Los datos de actividad se expresaron en % y se ajustaron a ecuaciones de regresión no lineal con el software ORIGIN 8.6 (OriginLab) que describieran su comportamiento, además, de la realización de un ANOVA de una vía con una comparación de medias de Tukey con un $p \geq 0.05$ para ver diferencias entre la presencia y ausencia de CTX.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto de la CTX sobre la actividad de la pkBADH

En el ensayo de actividad de pkBADH con CTX 0.4 mM, la actividad disminuyó un 19%, mientras que con 1 mM la disminución fue de un 23% (Figura 3). Se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento que no contenía CTX con respecto a los que, si contenían CTX, sin embargo, se esperaba un mayor grado de inhibición al aumentar 2.5 veces la concentración de CTX (0.4 y 1 mM CTX). En la literatura se considera que una disminución del 50% de la actividad de una enzima es suficiente para afirmar que ha sido inhibida. Al no alcanzar dicho porcentaje en este ensayo, no es posible concluir que CTX es inhibidor de la pkBADH.

Por otra parte, si se sabe que los pacientes a los que se les administra CTX sufren de problemas renales, es posible hipotetizar que CTX puede tener un efecto inactivador sobre algunas enzimas que se relacionan con la función renal tal y como se ha propuesto para la pkBADH. Con base a lo anterior se procedió a llevar a cabo experimentos para demostrar si CTX es un inactivador de la pkBADH. Debido, a que GB es muy importante como osmoprotector y osmorregulador y si sus niveles disminuyen provocaría daños perjudiciales.

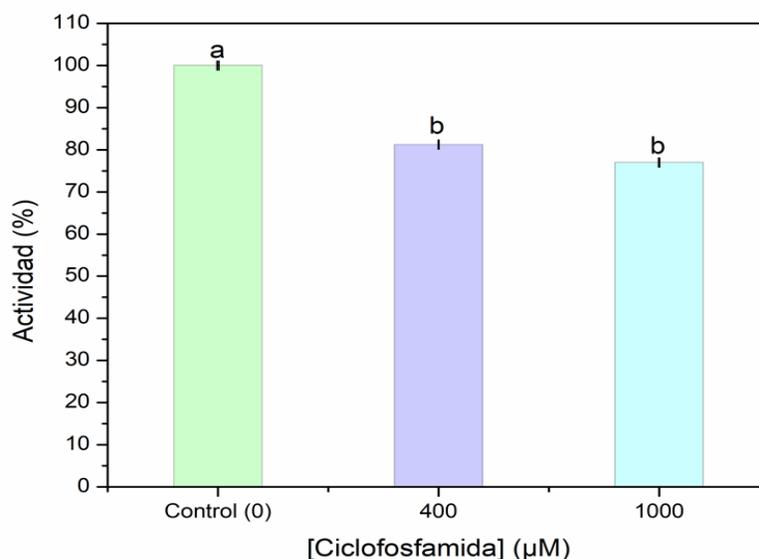


Figura 3. Efecto de la ciclofosfamida (CTX) en la actividad de la pkBADH. (Comparación de medias de Tukey con una significancia de $P \leq 0.05$)

6.2 Efecto Inactivador de la CTX Sobre la pkBADH

Al incubar a la enzima con CTX, las cinéticas de inactivación mostraron un comportamiento monofásico (decaimiento exponencial sencillo), donde la concentración mínima utilizada de 200 μM inactivó a la pkBADH 44% y la máxima utilizada de 2000 μM inactivó en un 70% en un lapso de 120 minutos con respecto al control (Figura 4). El grado de pérdida de la actividad aumentó conforme se aumentó la concentración de CTX (Figura 4). La rapidez con la que se pierde la actividad a concentraciones mayores a 200 μM , es similar en todas las concentraciones de fármaco utilizadas (Tabla 1), por lo tanto, la K_{obs} no es linealmente dependiente de las concentraciones CTX utilizada (Tabla 1). Además, la actividad enzimática cae con amplitudes similares independientemente de la concentración de CTX y estas amplitudes varían entre el 48 y 70%, es decir a partir de ese punto los cambios en la actividad no son tan abruptos sin embargo la actividad enzimática sigue decayendo con una menor rapidez (Figura 4).

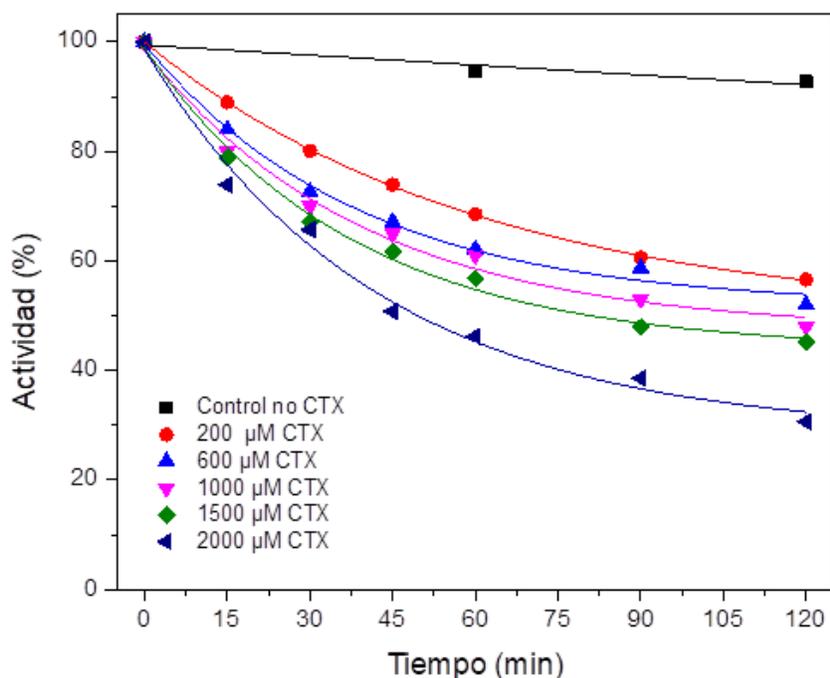


Figura 4. Cinética de inactivación de pkBADH con concentraciones variables de CTX.

1. Constante de decaimiento aparente y amplitud para cada concentración de CTX.

[CTX] μM	K_{obs} (min^{-1})	A_1 (%)
200	0.0163	50
600	0.0258	48
1000	0.0252	51
1500	0.0267	55
2000	0.0238	70

Los resultados anteriores muestran que la CTX es un inactivador de la pkBADH. Una posible explicación del efecto de la CTX sobre la actividad de la pkBADH es que, el fármaco al ser un compuesto oxidante puede actuar sobre la cisteína catalítica oxidándola y por consiguiente provocar la disminución en la actividad de la pkBADH. A la fecha, no se encontraron estudios sobre el efecto de la CTX en enzimas *in vitro*, por lo que es difícil contrastar los resultados

obtenidos en el trabajo. Sin embargo, Stankiewicz y colaboradores (2002) encontraron que la CTX oxida al glutatión. Por otra parte, en estudios realizados en ratones a los que se les administró éste fármaco, se encontró que disminuía la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas como: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa (Stankiewicz *et al.*, 2002).

Para analizar si el efecto inactivador de la CTX era consecuencia de la disociación de la pkBADH a su forma inactiva en dímeros, se llevó a cabo una electroforesis nativa. La Figura 5 muestra que la enzima permanece en su estado tetramérico (216 kDa) en presencia de concentraciones variadas de CTX, lo anterior indica que la disminución de actividad de la pkBADH no se debe a disociación de la enzima. Los resultados obtenidos sugieren que la disminución en la actividad debe estar relacionada principalmente con la oxidación de grupos sulfhidrilo.

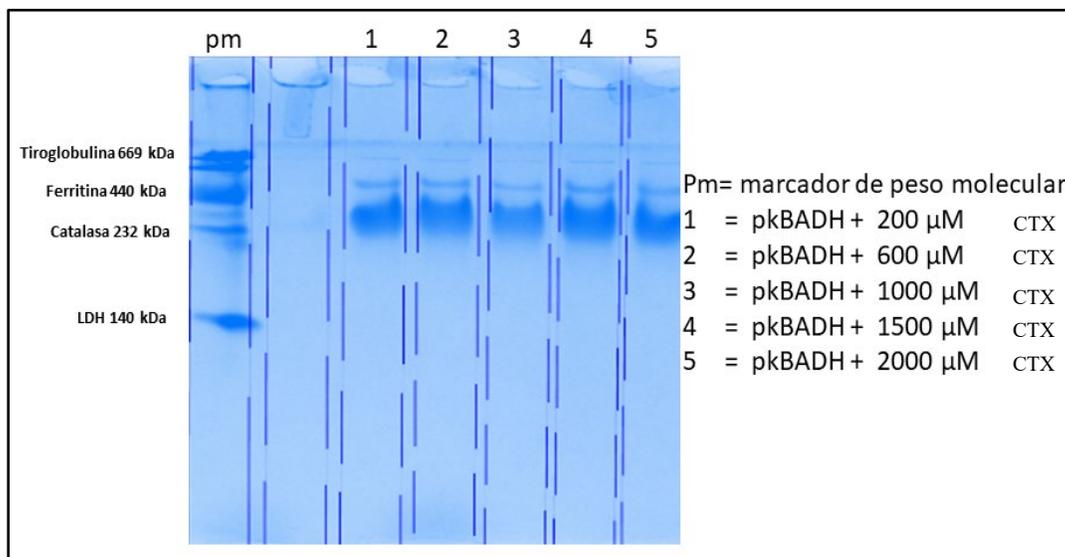


Figura 5. Electroforesis nativa de la pkBADH en presencia de CTX 200, 600, 1000, 1500 y 2000 μM. Gel de poliacrilamida al 10% con glicerol, teñido con Coomassie coloidal.

Para investigar si la CTX pudiera estar inactivando a la pkBADH mediante la oxidación de las cisteínas en el sitio activo, se realizó un acoplamiento molecular (Docking), para generar los modelos predictivos de la interacción pkBADH con CTX. Para la generación de estos modelos se usan ecuaciones y algoritmos que incorporan factores como las energías libres de Gibbs (ΔG),

cargas y campos de fuerza, además de seguir un camino estocástico para generar cada modelo. Para elegir a los mejores modelos se siguieron los siguientes criterios: 1) espontaneidad, es decir que el valor de ΔG sea negativo y 2) interacción sólo con los residuos seleccionados (cisteínas 288 y 289). Los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular muestran que la CTX puede interaccionar mediante los átomos de cloro con los residuos seleccionados cisteína 288 y 289 del sitio activo de la pkBADH (Figura 6A y Figura 6B). Además, se observó que otros átomos de la molécula de CTX como el nitrógeno y el oxígeno (también átomos muy electronegativos) interaccionan con la cisteína catalítica 288 (Figura 6C). Adicionalmente, se encontró que la CTX interacciona con residuos que no participan en la catálisis, pero son importantes para la unión del sustrato BA, como tirosina 158, glicina 161 y triptófano 165 (Figura 7), lo que sugiere que el fármaco podría estar provocando también cambios a nivel de sitio activo de la pkBADH.

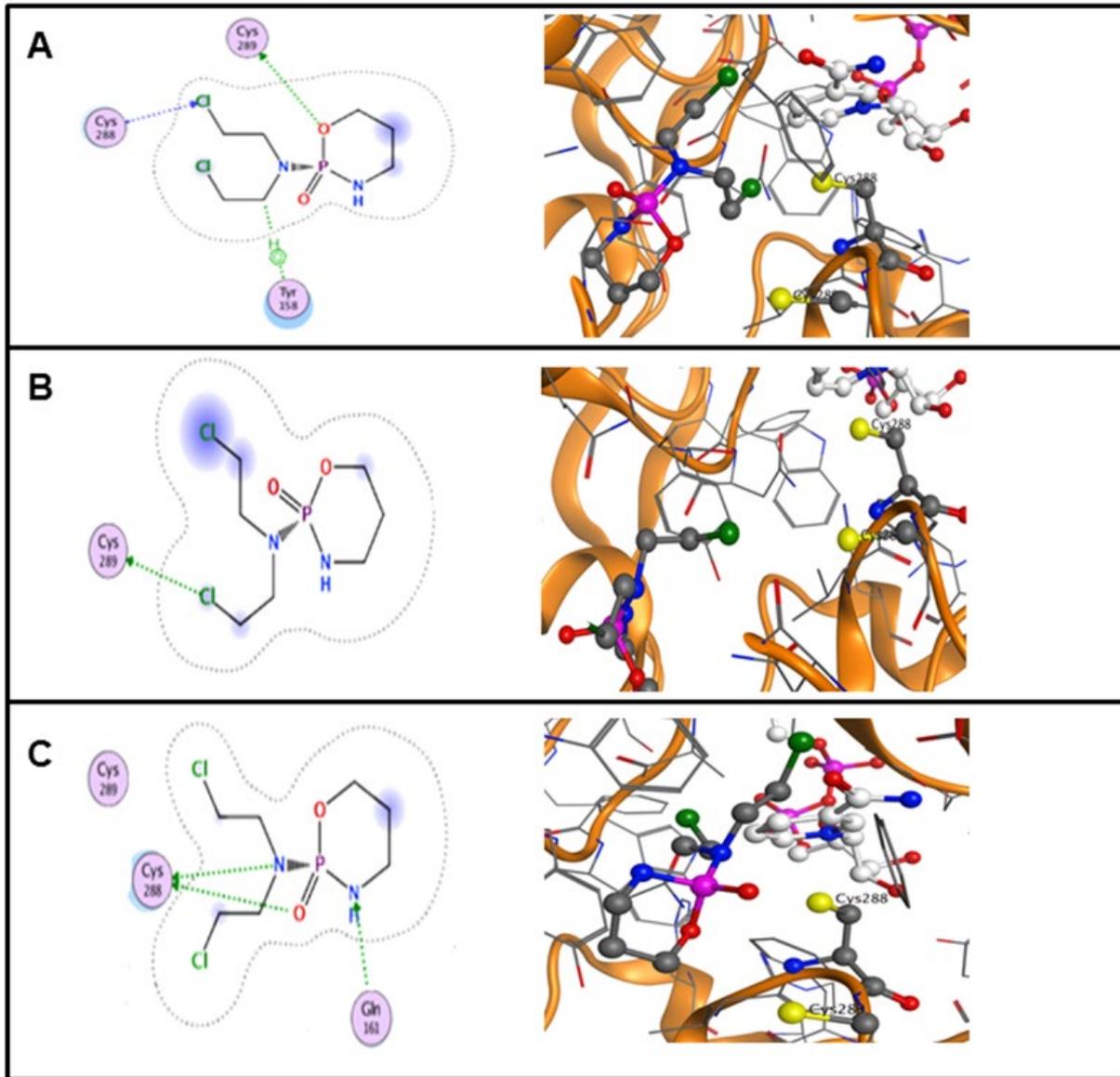


Figura 6. Acoplamiento molecular pkBADH–Ciclofosfamida. Panel A); interacción del átomo de cloro de la ciclofosfamida con la cisteína catalítica 288; Panel B) interacción de un átomo de cloro de la molécula de ciclofosfamida con la cisteína vecinal 289; Panel C) interacción de los átomos de nitrógeno y oxígeno de la ciclofosfamida con la cisteína catalítica 288. Del lado izquierdo están los esquemas de interacción 2D y del lado derecho están los modelos 3D.

Para tener un control se utilizó al Disulfiram (DSF), ya descrito por Ayala y colaboradores (2007) como inactivador de la pkBADH, el cual es un reactivo específico de grupos sulfhidrilo (Figura 8).

Como era de esperarse, DSF se introduce al sitio activo y es capaz de interactuar con la cisteína catalítica 288 y vecinal 289 (Figura 8A)

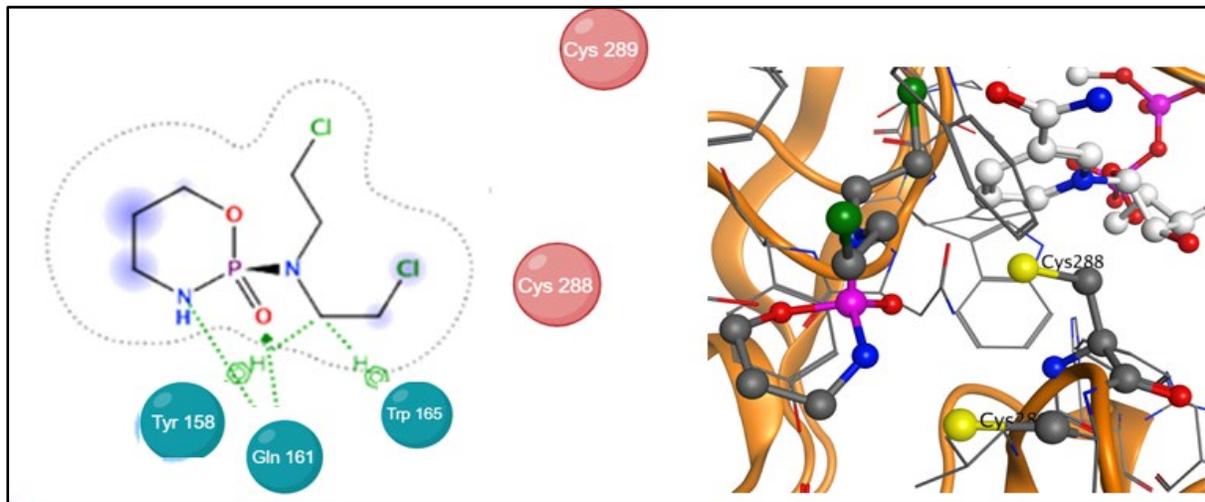


Figura 7. Acoplamiento molecular pkBADH–ciclofosfamida, interacción de la ciclofosfamida con aminoácidos no catalíticos presentes en el sitio activo de la enzima. (Del lado izquierdo están los esquemas de interacción 2D y del lado derecho el modelo 3D).

El disulfiram puede interactuar con residuos que no son importantes para la unión de BA, pero sí en la integridad del sitio activo como lo son la asparagina 449, glicina 161, tirosina 168 y serina 451 (Figura 8B).

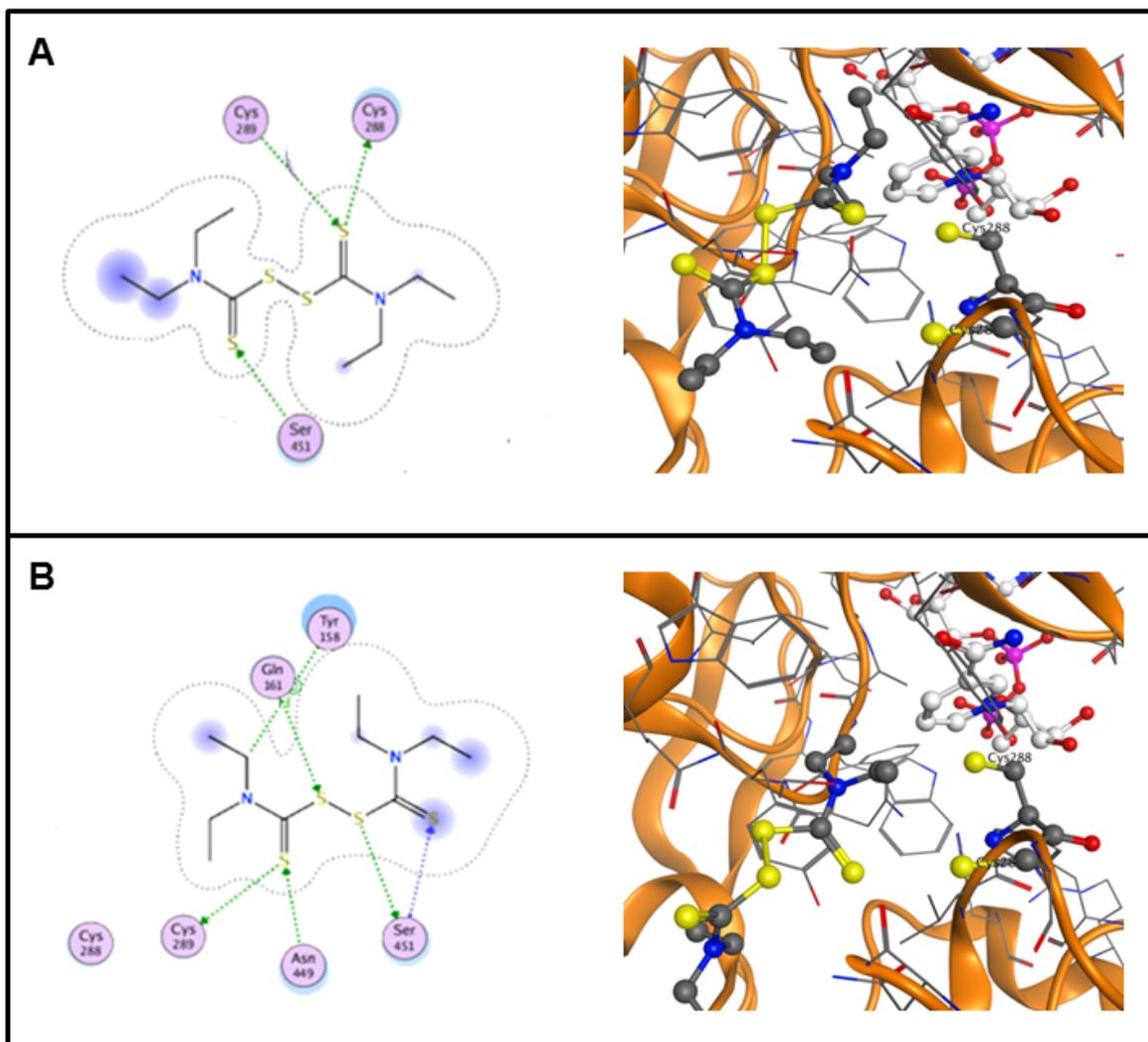


Figura 8. Acoplamiento molecular pkBADH–Disulfiram. Panel A) Interacción del Disulfiram con la cisteína catalítica 288 y la vecinal 289; Panel B) Interacción de Disulfiram con diferentes residuos del sitio activo. (Del lado izquierdo están los esquemas de interacción 2D y del lado derecho están los modelos 3D).

Los datos generados por el acoplamiento molecular apoyan la conclusión de que los oxidantes como CTX inactivan a la pkBADH, porque dichos compuestos atacan principalmente a los grupos sulfhidrilo de la enzima. El grupo sulfhidrilo importante para la catálisis en la pkBADH es el de la cisteína 288, adicionalmente la cisteína vecinal 289 susceptible también a oxidación puede formar un puente disulfuro con la cisteína 288, esto disminuiría también la actividad de la enzima. Lo anterior apoya los resultados obtenidos para la pkBADH en presencia de peróxido de hidrógeno,

donde se encontró que éste también causa una inactivación dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno y del tiempo de incubación (Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011). Otro fármaco inactivador estudiado previamente es el DSF, el cual inactivó rápidamente a la pkBADH con concentraciones menores a 30 μM , este resultado se explicó en función de la capacidad que posee el fármaco de oxidar a los grupos sulfhidrilo presentes en la cisteína catalítica y en la vecinal (Ayala-Castro *et al.*, 2007).

6.3 Efecto de los Ligandos de la pkBADH en la inactivación por CTX

Se realizaron cinéticas de inactivación de la pkBADH con CTX (1 mM) incluyendo cada uno de los ligandos de la enzima individualmente. Se encontró que conforme aumentaba la concentración de NAD^+ , aumentaba el porcentaje de inactivación hasta llegar a un 94% (Figura 9). La coenzima aumentó el grado de inactivación en comparación a la pkBADH incubada sólo con CTX lo cual sugiere que la CTX, puede llegar más fácilmente a la cisteína catalítica cuando el NAD^+ abre el sitio de unión para BA, esto último de acuerdo con el mecanismo cinético (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000). El efecto más notorio del NAD^+ sobre el grado de inactivación, se observó en las concentraciones de 10, 50 y 100 μM ; a 10 μM de NAD^+ hay un 20% más de inactivación que sólo con la CTX, con 50 μM la actividad disminuyó 30% mientras que con 100 μM disminuyó 50% en comparación a la actividad cuando solo se incubó pkBADH con CTX.

Por otra parte, las concentraciones de 200 y 500 μM de NAD^+ tienen un comportamiento similar al encontrado con 100 μM de NAD^+ , a partir de 100 μM ya no hay un aumento considerable del grado de inactivación, esto puede ser debido a que la K_m que presenta la pkBADH por el NAD^+ es de 45.5 μM (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Por más mínima que sea la concentración de NAD^+ el grado de inactivación aumenta, donde hay un efecto más claro es entre la concentración de 50 y 100 μM de NAD^+ concentraciones próximas a la K_m que presenta la enzima por el NAD^+ . Lo anterior, se puede deber a que, al haber una gran cantidad de NAD^+ siempre se mantendrá el sitio activo abierto, ya que al haber una gran cantidad de moléculas de NAD^+ al liberarse una, se une otra permaneciendo el sitio activo abierto casi de manera continua.

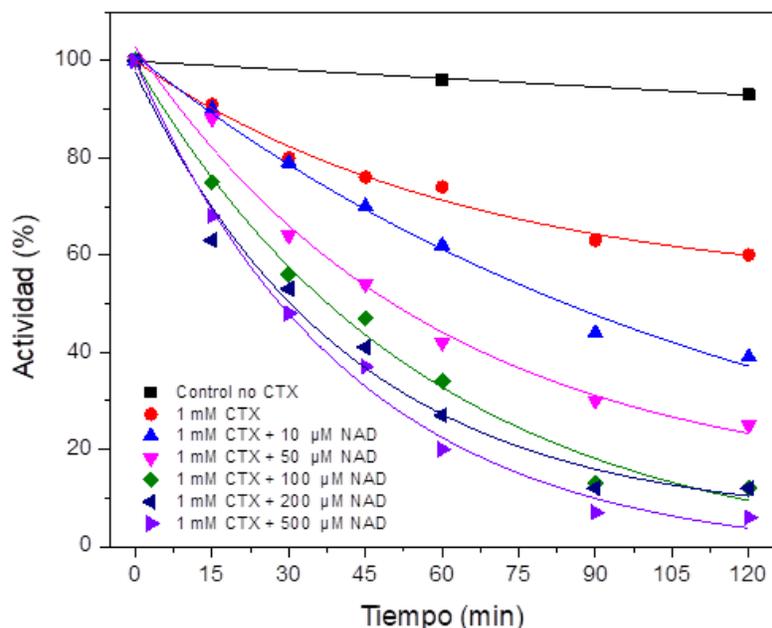


Figura 9. Efecto del NAD^+ en la inactivación de la pkBADH con 1 mM de CTX.

Las BADHs de *P. aeruginosa* y de hojas de amaranto mostraron un comportamiento similar, al encontrado en este estudio, en presencia de la coenzima y DSF (Velasco-García *et al.*, 2003). Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto (2011) demostraron que el NAD^+ aumenta el grado de inactivación de la pkBADH en presencia de peróxido de hidrógeno. La inactivación de la pkBADH por CTX en presencia del NAD^+ , podría ser relevante *in vivo*, por que es probable que una proporción importante de la enzima total exista como un complejo binario con la coenzima oxidada (E-NAD^+), además las concentraciones de CTX utilizadas en las terapias están en el intervalo de 40-60 mg/kg de peso, cantidades que son lo suficientemente altas para provocar la inactivación de la pkBADH principalmente en hígado y riñón, ya que en estos órganos se metaboliza y excreta la CTX y sus metabolitos (Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011; Bonella *et al.*, 2017).

Los resultados de la cinética de inactivación de la pkBADH por CTX en presencia del NADH muestran que este producto no aumenta ni disminuye el grado de inactivación (Figura 10). En el estudio sobre la inactivación de la pkBADH por disulfiram, se encontró que el NADH protegió a la enzima de la inactivación (Ayala-Castro *et al.*, 2007), dicho resultado es completamente opuesto al encontrado en este estudio. Una posible explicación sería la naturaleza de cada compuesto, en el caso del DSF este es un fármaco que solo tiene afinidad por los grupos sulfhidrilo, mientras que la

CTX es un fármaco altamente oxidante capaz de oxidar otros aminoácidos en el sitio activo tal y como lo muestran los resultados del acoplamiento molecular. Por otra parte, en la inactivación de la pkBADH provocada por el peróxido de hidrógeno el NADH no tuvo efecto en la inactivación tal y como se encontró en éste estudio (Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011), lo cual apoya la idea de que la CTX además de oxidar a las cisteínas puede estar oxidando a otros aminoácidos del sitio activo, con los cuales el NADH no interactúa, por lo que no se observa efecto protector ni de aumento en la inactivación de la enzima.

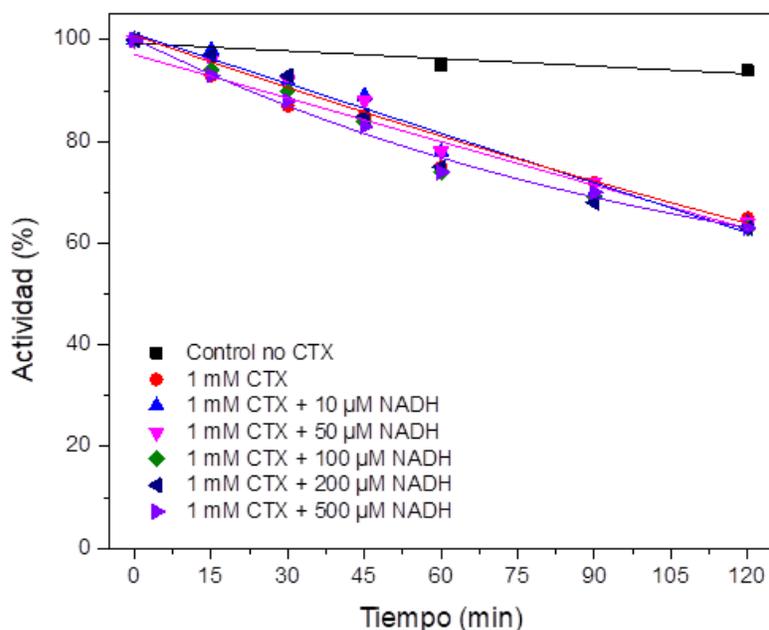


Figura 10. Efecto del NADH en la inactivación de la pkBADH causada por CTX.

Cuando se añadió el sustrato BA a la mezcla de inactivación, se encontró que éste no tiene ningún efecto debido a que no aumenta ni disminuye el grado de inactivación de la pkBADH por CTX como se observa en la Figura 11. Cuando se utilizó el producto GB, de igual manera no se encontró que éste afectara la inactivación de la pkBADH (Figura 12). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la inactivación de la pkBADH por peróxido de hidrógeno, donde tanto el sustrato betaína aldehído como el producto glicina betaína no tienen efecto en la inactivación de la pkBADH (Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011).

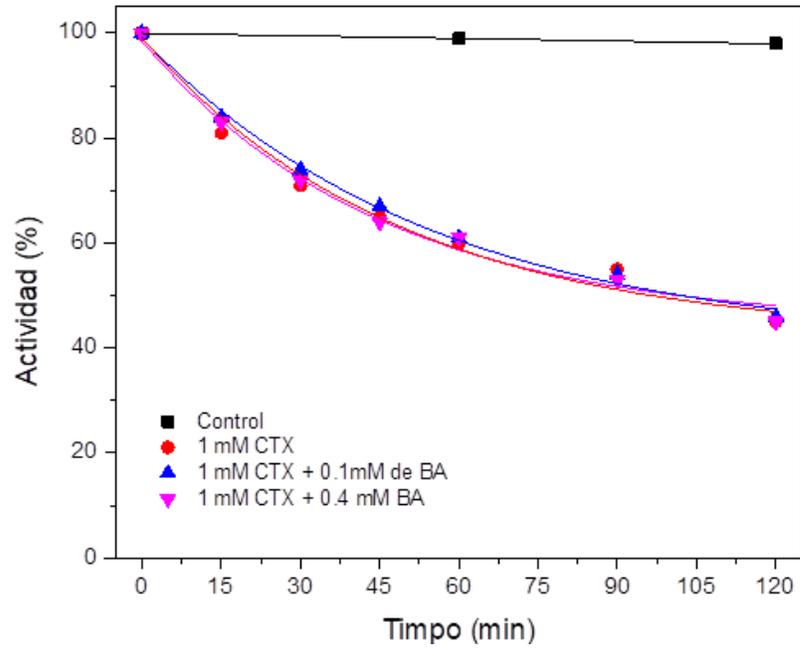


Figura 11. Efecto de betaína aldehído (BA) en la inactivación de la pkBADH por CTX.

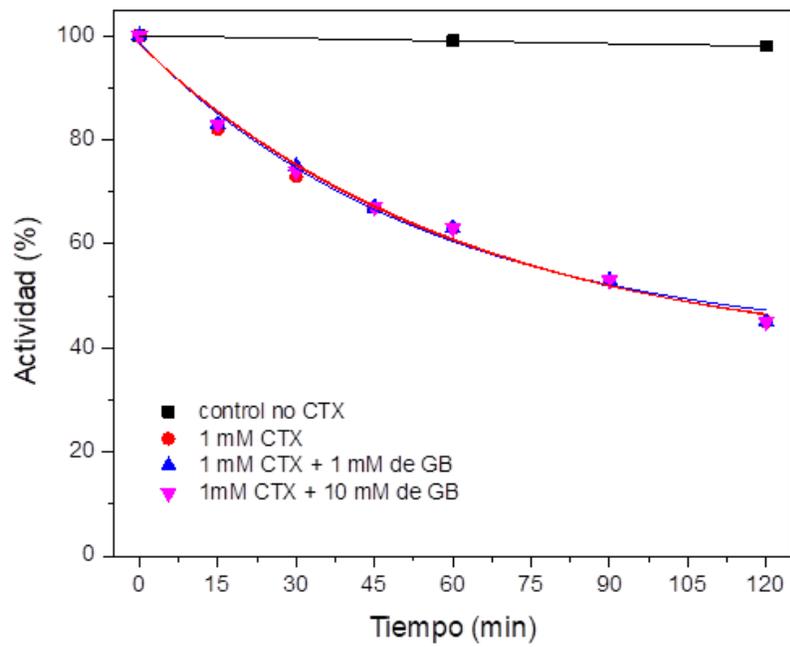


Figura 12. Efecto de glicina betaína (GB) en la inactivación de la pkBADH provocada por CTX.

La ausencia de un efecto en la inactivación de la pkBADH inducida por CTX en presencia de BA y GB (Figura 11 y Figura 12), concuerda con el mecanismo cinético de la pkBADH, dado que el sustrato BA no puede unirse a la enzima antes que la coenzima (NAD^+) debido a que el sitio activo no está disponible para que se una, la CTX inactivará a la enzima, independientemente de si está o no presente BA o GB (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

6.4 Reversibilidad de la Inactivación de la pkBADH por CTX

Dado que la CTX puede estar oxidando a los grupos sulfhidrilo del sitio activo de la pkBADH, se analizó la reversibilidad de la inactivación utilizando agentes reductores tales como DTT, β -mercaptoetanol y GSH. La pkBADH inactivada con 2 mM de CTX e incubada con DTT, recuperó un 96% de su actividad, cuando se incubó con β -mercaptoetanol se obtuvo una reactivación de 93 %, y en presencia de glutatión (GSH) la enzima no se reactivó (Figura 13).

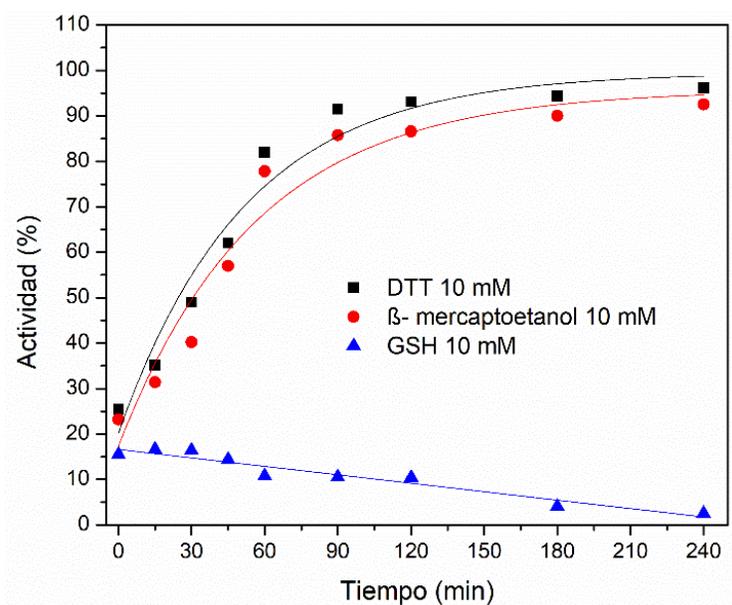


Figura 13. Efecto de los agentes reductores DTT, β -mercaptoetanol y GSH en la inactivación de la pkBADH.

2. Constantes de crecimiento aparente y amplitudes para cada agente reductor.

[Agente reductor] 10 mM	K _{obs} (min)	A (%)
DTT	0.0192	79
β- mercaptoetanol	0.0175	78
GSH	-----	---

La reactivación de la pkBADH con agentes reductores sugiere que los grupos sulfhidrilo fueron oxidados por CTX. Los resultados obtenidos en éste trabajo concuerdan con otros estudios donde la BADH fue inactivada con DSF y con peróxido de hidrógeno. Dichos estudios mostraron que el DTT revirtió la inactivación por disulfiram hasta en un 90% y un 85% cuando se inactivó con peróxido de hidrógeno (Velasco-García *et al.*, 2003; Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011). Por otra parte, el β-mercaptoetanol reactivó a la pkBADH inactivada por peróxido de hidrógeno en un 50% (Rosas-Rodríguez y Valenzuela-Soto, 2011). Lo anterior concuerda con lo obtenido en la reactivación de la pkBADH inactivada con CTX, donde se muestra que el DTT y el β-mercaptoetanol lograron revertir dicha inactivación por arriba del 90%. Interesantemente, en dichos estudios el agente reductor que no tiene efecto es el GSH, tal y como se encontró en éste estudio y como se muestra en la Figura 13.

Los resultados obtenidos muestran que GSH no puede revertir la inactivación de la pkBADH por CTX, esto podría tener un efecto perjudicial principalmente en células hepáticas y renales debido a que el GSH es el agente reductor fisiológico, y al no estar activa la pkBADH se vería afectada la osmorregulación y osmoprotección de estas células.

El DTT y β-mercaptoetanol resultaron ser los mejores reactivadores de la pkBADH, una razón podría ser que son moléculas pequeñas con una gran capacidad reductora, la falta de efecto del GSH se puede deber a que es una molécula muy voluminosa en comparación a los agentes reductores mencionados anteriormente, esa voluminosidad impide que el GSH ingrese al sitio activo y pueda reactivar a la pkBADH.

6.5 Mecanismo Propuesto para la Inactivación de pkBADH por Ciclofosfamida

La CTX se introduce en el sitio activo, y al poseer en su estructura átomos de cloro altamente oxidantes, estos pueden interactuar con los sulfhidrilos presentes en las cisteínas del sitio activo y así oxidarlas. La oxidación puede ser llevada a cabo por el átomo de cloro, el cual sustrae el átomo de hidrógeno presente en el sulfhidrilo; al estar oxidado el azufre este busca su conformación estable y al tener una cisteína vecinal puede formar un puente disulfuro intramolecular (Figura 14). Este mecanismo concuerda con lo reportado por Muñoz-Clares y colaboradores, (2017) donde discuten la importancia de la cisteína vecinal, la cual puede inducir un puente disulfuro intramolecular con la vecinal al estar en presencia de agentes oxidantes, como un mecanismo de protección para la enzima. Además, dichos autores muestran que agentes reductores como el DTT pueden revertir dicha inactivación, sin embargo, fisiológicamente el DTT no se encuentra presente en las células. El agente reductor fisiológico es el GSH, pero como se ha demostrado en el presente estudio y en otros, este no puede revertir la inactivación de la enzima, posiblemente por qué la molécula de GSH no puede entrar al sitio activo y ejercer su función reductora.

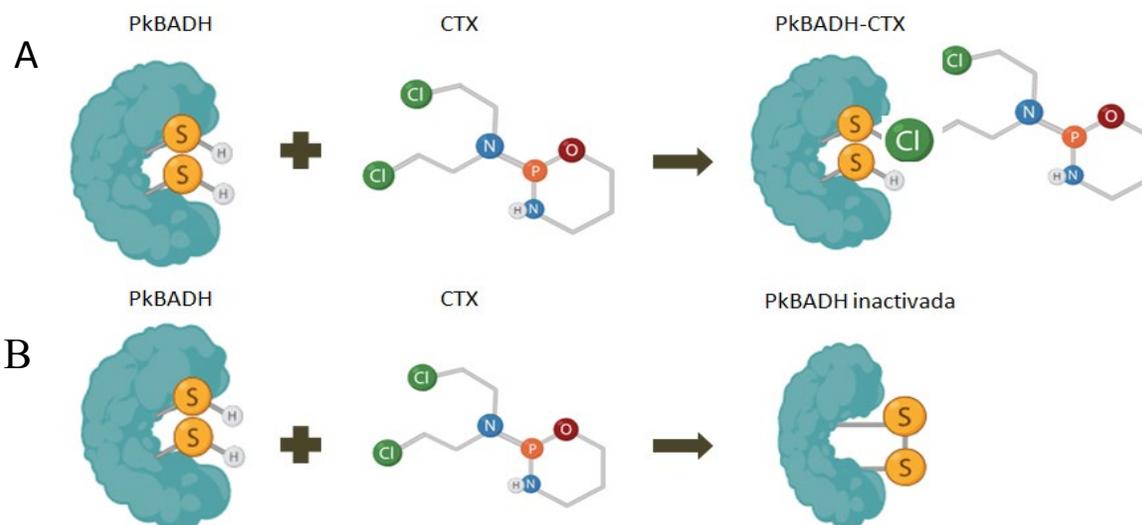


Figura 14. Mecanismo de reacción de CTX con pkBADH. A) oxidación del grupo sulfhidrilo por el cloro de CTX. B) formación de un puente disulfuro intramolecular entre cisteína catalítica y cisteína vecinal.

7. CONCLUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que la ciclofosfamida a concentraciones fisiológicas inactiva a la p_kBADH a través de la oxidación de las cisteínas presentes en el sitio activo, y que el NAD⁺ aumenta el grado de inactivación facilitando la accesibilidad de CTX a las cisteínas presentes en el sitio activo. Esta, inactivación es irreversible en condiciones fisiológicas, debido a que el GSH no revierte la inactivación.

8. PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos sería importante analizar el efecto en otras enzimas de importancia biológica, tanto en hígado como riñón, debido a que son los órganos donde se metaboliza y excreta el fármaco, este tipo de estudios arrojaría información importante sobre sus posibles efectos secundarios.

9. REFERENCIAS

- Ahmed R.A. 2018. Hepatoprotective and ant apoptotic role of aged black garlic against hepatotoxicity induced by cyclophosphamide. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 79(1): 1-8.
- Allen E., Anderson D., Florang V., Khanna M., Hurley T., Doorn J. 2010. Relative Inhibitory potency of molinate and metabolites with aldehyde dehydrogenase 2: implications for the mechanism of enzyme inhibition. *Chemical Research in Toxicology*. 23(11): 1843-1850.
- Álvarez L., Levin C., Merola F., Bizouarn T., Pasquier H., Baciou L., Rusconi F., Eared M. 2010. Are the fluorescent properties of the cyan fluorescent protein sensitive to conditions of oxidative stress?. *Photochemistry and Photobiology*. 86(1): 55-61.
- Ayala-Castro H., Valenzuela-Soto E.M., Figueroa-Soto C.G., Muñoz-Clares R.A. 2007. Complex, unusual conformational changes in kidney betaine aldehyde dehydrogenase suggested by chemical modification with disulfiram. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 468(2): 167–73.
- Ayala-Castro H.G, Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. 2017. Renal betaine aldehyde dehydrogenase activity is modulated synergistically by urea, sodium and potassium under physiological conditions. In: *Dehydrogenases: Biochemistry, functions and role in disease*. M. Collins (ed.) (English). Nova Science, New York, pp 23-38.
- Banday A., Lokhandwala V. 2011. Oxidative stress causes renal angiotensin II type 1 receptor upregulation, Na⁺/H⁺ Exchanger 3 overstimulation, and hypertension. *Hypertension*. 57 (3): 452-459.
- Beck F., Dörge A., Thureau K., Guder W. 1990. Cell osmoregulation in the countercurrent system of the renal medulla: the role of organic osmolytes. En: *Beyenbach K.W. (ed). Cell Volume Regulation*. Karger, Basel, 132–158 pp.
- Boch J., Nau-Wagner G., Kneip S., Bremer E. 1997. Betaine aldehyde dehydrogenase from *B. subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Archives of Microbiology*. 168(4): 282-289.
- Bonda D., Lee H., Blair J., Zhu X., Perry G., Smith M. 2011. Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics*. 3(3): 267-270.
- Bonella B., Warley F., Gutiérrez P., Ferreyro B. 2017. Hyponatremia induced by high dose cyclophosphamide therapy: a retrospective cohort study cyclophosphamide and hyponatremia. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas*. 74(3): 201-206.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantifies of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Bruining D., Van Roon E., Hoogedoorn M. 2011. Cyclophosphamide-induced symptomatic hyponatremia. *The Netherlands Journal of medicine*. 69(4): 192-5.
- Burg M.B., Ferraris J.D. 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 283(12), 7309–7313.

- Chern M., Pietruszko R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase e3 isoenzyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 213(2): 561-568.
- Chern M., Pietruszko R. 1999. Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochemistry and Cell Biology*. 77(3): 179–87.
- Cuce G., Çetinkaya S., Koc T., Kalakan S., Akoce M. 2015. Chemoprotective effect of vitamin E in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 232: 7-15.
- Delgado-Gaytán M.F., Rosas-Rodríguez J.A., Yepiz-Plascencia G., Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. Cloning and molecular characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase involved in the biosynthesis of glycine betaine in with shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemico-Biological Interactions*. 276: 65-74.
- Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., Goloubinoff P. 2001. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *Journal of Biological Chemistry*. 276(43): 38586-39591.
- Dragolovich J., Pierce S.K. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Journal of Experimental Zoology*. 270(5): 417-425.
- Falkenberg P., Strom A. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *E.coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1034(3): 253-259.
- Figueroa-Soto C.G., López-Cervantes G., Valenzuela-Soto E.M. 1999. Immunolocalization of betaine aldehyde dehydrogenase in porcine kidney. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 258(3): 732–736.
- Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. 2000. Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 269(2): 596–603.
- Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. 2018. Glicine betaine rather than acting only as an osmolyte also plays a role as regulator in celular metabolism. *Biochimie*. 147: 89-97.
- Giles N., Watts A., Giles G., Fry F., Littlechild J., Jacob C. 2003. Metal and Redox Modulation Review of Cysteine Protein Function. *Chemistry and Biology*. 10(10): 677–693.
- Gilbar P.J., Richmond J., Wood J., Sullivan A. (2012). Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion induced by a single dose of oral cyclophosphamide. *The Annals of Pharmacotherapy*. 46(9): 18- 23.
- González-Segura L., Velasco-García R., Muñoz-Clares R.A. 2002. Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*. 361(3): 577-585.
- González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Muñoz-Clares R.A., Horjales E. 2009. The Crystal Structure of a ternary Complex of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides New Insight into the Reaction Mechanism and Shows A Novel Binding Mode of the 2' Phosphate of NADP and A Novel Cation Binding Site. *Journal of Molecular Biology*. 385(2): 542-557.

- Go E.K., Jung K.J., Kim J.Y., Yu B.P., Chung H. 2005. Betaine suppresses proinflammatory signaling during aging: the involvement of nuclear factor kappa b via nuclear factor-inducing kinase/Ikappa B kinase and mitogen activated protein kinase. *Journal of Gerontology*. 60(10): 1252-1264.
- Guzmán-Partida A.M, Valenzuela-Soto E.M. 1998. Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119(3): 485-491.
- Halavaty A., Rich R., Chen C., Joo J., Minasov G., Dubrovskaya I., Winsor J., Myszkowski D., Duban M., Shuvalova L. 2015. Structural and functional analysis of betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 71(5): 1159-1175.
- Huang W., Lin J. 2004. Acute renal failure following ingestion of manganese-containing fertilizer. *Journal of toxicology: Toxicology Clinical*. 42(3): 305-307.
- Jackson C.B. 2015. Update on the distribution and evolution of the aldehyde dehydrogenase superfamily in vertebrates and biochemical and polymorphic characteristics of human ALDH1B1. [Thesis Doctoral]. Colorado. U.S.A.: Universidad de Colorado.
- Johansson K., Ramaswamy S., Eklund H., El-Ahmad M., Hjelmqvist L., Jörnvall H. 1998. Structure of betaína aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science*. 7(10): 2106-2117.
- Kitson T.M. 1977. The disulfiram-ethanol reaction: a review. *Journal of Studies on Alcohol*. 38(1): 96-113.
- Končítiková R., Vigouroux A., Kopecna M., Sabela M., Morera S., Kopecny D. 2019. Kinetics and structural analysis of human ALDH9A1. *Bioscience Reports*. 39(4): 1-12.
- Koppaka V., Thompson D., Ying C., Ellerman M., Nicolaou K., Juvonem R., Petersen D., Deitrich R., Hurley T., Vasiliou V. 2012. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological Reviews*. 64(3): 520-539.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Lee Y.C., Park J.S., Lee C.H., Bae S.C., Kim I.S., Kang C.M., Bae S.C., Kim L.S., Kim G.H. (2010) Hyponatremia induced by low-dose intravenous pulse cyclophosphamide. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 25(5): 1520-1524.
- Lin S., Chen J. 1996. Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 34(3): 376-380.
- Lipski J., Shen M., Naylor S. 2001. Overview *in vitro* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chemical Biological Interactions*. 130: 81-91.
- Livingstone J.R., Maruo T., Yoshida I., Tarui Y., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutui N., Hirasawa E. 2003. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from oat sativa. *Journal of Plant Research*. 116(2): 133-140.

- Macías-García N. 2008. Estudio fase 1 y 2 para evaluar la quimio-sensibilidad y toxicidad del uso de topotecan/ciclofosfamida en niños con sarcomas refractarios a primera línea de tratamiento. [Tesis Doctoral] Instituto de Nutrición Salvador Zubirán, México, DF, México.
- Marchitti S., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. 2008. Non-P450 Aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drugs Metabolism and Toxicology*. 4(6): 697-720.
- Martin C.J., Goeddeke-Merickel C.M. 2005. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Nephrology Nursing Journal*, 23(5): 683-685.
- Modal R., Husky G., Koldingsnes W. 1993. Intravenous and oral cyclophosphamide pulse therapy in rheumatic diseases: side effects and complications. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 11(8): 283-290.
- Monteagudo-Sáez I., Ortega C., Nuño L., Lopez F.J. 2005. Citostáticos de empleo en enfermedades reumatológicas. *Medicine*. 9(28): 1840-1847.
- Muñoz-Bacasehua C. 2017. Efecto de los ligandos de la betaína aldehído deshidrogenasa de cerdo en su sitio activo. [Tesis maestría]. Hermosillo, Sonora, México. CIAD A.C.
- Muñoz-Bacasehua C., Rosas-Rodríguez J.A., Arvizu-Flores A.A., Stephens-Camacho A., Soñanez-Organis J.G., Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. 2019. Heterogeneity of active sites in porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase is modulated by potassium. *Biochimie*. Artículo en revisión.
- Muñoz-Clares R.A., Valenzuela-Soto E.M. 2008. Betaine aldehyde dehydrogenase: evolution, physiological functions, mechanism, kinetics, regulation, structure and stability. In: E. Garcia-Hernandez y D.A. Fernandez-Velasco (eds). *Advances in Protein Physical Chemistry*. Research Signpost, Kerala. 279-302 pp.
- Muñoz-Clares R.A., González-Segura L., Díaz-Sánchez A. 2011. Crystallographic Evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. *Chemico-Biological Interactions*. 191(1): 137-146.
- Muñoz-Clares R.A., Díaz-Sánchez A, González-Segura L., Montiel C. 2010. Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 493(1): 71-81.
- Muñoz-Clares R.A., Gonzales-Segura L., Murillo-Melo D., Rivero-Rosas H. 2017. Mechanism of protection against irreversible oxidation of catalytic cysteine of ALDH enzymes: Possible role of vicinal cysteines. *Chemico-Biological Interactions*. 276: 52-64.
- Omdal R., Husby G., Koldingsnes W. 1993. Intravenous and oral cyclophosphamide pulse therapy in rheumatic diseases: side effect and complications. *Clinical Expert of Rheumatology*. 11(2): 281-8.
- Oyagbemi A.A, Omobowale O., Olowu R., Dada R.O. 2015. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *First International Journal of Andrology*. 48(7): 393-401.

- Riveros-Rosas H., González-Segura L., Julián-Sánchez A., Díaz-Sánchez A., Muñoz-Clares R.A. 2013. Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenase. *Chemico-Biological Interaction*. 202(1-3): 51-61.
- Rosas-Rodríguez J.A., Valenzuela-Soto E.M. 2010. Enzymes involved in osmolyte synthesis: ¿How does oxidative stress affect osmoregulation in renal cells?. *Life Science*. 87(17-18): 515-20.
- Rosas-Rodríguez J.A., Valenzuela-Soto E.M. 2011. Inactivation of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase by hydrogen peroxide. *Chemico-Biological Interactions*. 191(1-3): 159-64.
- Rosas-Rodríguez J.A., Flores-Mendoza H.F., Figueroa-Soto C.G., Morán-Palacio E.F., Valenzuela-Soto E.M. (2012). Structural and Activity Changes in Renal Betaine Aldehyde Dehydrogenase Caused by Oxidants. En: V. Lushchak y H.M. Semchyshyn (eds). *Oxidative stress-molecular mechanisms and biological effects*. In Tech, Londres, 231-252 pp .
- Ruíz-López J.C., Figueroa-Soto C.,G. Valenzuela-Soto EM. 2006. Manganese inactivation of renal betaine aldehyde dehydrogenase from swine. *EXCLI Journal*. 5: 140-9.
- Song J., Liu L., Li L., Liu J., Song Y. 2013. Protective effects of lipoic acid and mesna on cyclophosphamide- induced haemorrhagic cystitis in mice. *Cell Biochemistry and Function* 32(4): 125-132.
- Stankiewicz A., Skrzydlewska E., Makiela M. 2002. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 19(2): 67-82.
- Steinmetz C.G., Xie P. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*. 5(5): 701- 711.
- Umeneshi F., Yoshirahara S., Narikiyo T., Schrier R. 2005. Modulation of hypertonicity induced aquaporin 1 by sodium chloride, urea, betaína and heat shock in murine renal medullary cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 16(3): 600-607.
- Valenzuela-Soto E.M., Muñoz-Clares R.A. 1994. purification and proprieties od Betaine Aldehyde Dehydrogenase Extracted from Detached leaves of *Amaranthus hypocondriacus* L. Subjectes to a Water Deficit. *Journal of Plant Physiology*. 143(2): 145-152.
- Valenzuela-Soto E.M., Velasco-García R., Mujica-Jiménez C., Gaviria-Gonzales L., Muñoz-Clares R.A. 2003. Monovalent cation requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *P.aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chemico-Biological Interactions*. 143: 139-148.
- Valenzuela-Soto E.M., Ayala-Castro H.G., Muñoz-Clares R.A., 2005. Effects of monovalent and divalent cations on the thermostability of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. En: E. Maser., B. Plapp, R. Lindahl, H. Weiner (eds). *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 12, Purdue University Press, Purdue 104-109 pp.
- Vasiliou V., Nebert D.W. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics*. 2 (2): 138-143.

- Vasiliou V., Thompson D., Smith C., Fujita M., Chen Y. 2013. Aldehyde dehydrogenases: From eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*. 202(1-3): 2-10.
- Vaziri N. 2004. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 13(1): 93-99.
- Velasco-García R., Mujica-Jiménez C., Mendoza-Hernández G., Muñoz-Clares R.A. 1999. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 181(4): 1292-1300.
- Velasco-García R., Chacón-Aguilar V., Hervert-Hernández D., Muñoz-Clares R.A. 2003. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chemico-Biological Interactions*. 143: 149-58.
- Yu H., Wang Y., Yong T., She Y., Fu F., Li W. 2014. Heterologous expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Ammopiptanthus Nanus* confers high salt and heat tolerance to *Escherichia coli*. *Gene*. 549(1): 77-84.