

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

**EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA
ACTIVIDAD Y PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA
BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE RIÑÓN
DE CERDO**

POR:

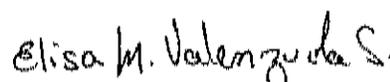
JESÚS ALFREDO ROSAS RODRÍGUEZ

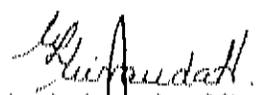
TESIS APROBADA POI, LA
COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO HEQUISITO PARCIAL PAHA OBTENER EL GHADO DE
HERMOSILLO, SON. JULIO DEL 2007
MAESTRIA EN CIENCIAS

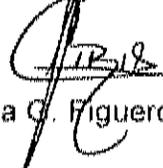
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Jesús Alfredo Rosas Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias.


Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Director de tesis


Dra. Maria de Lourdes Miranda Ham


Dr. Humberto Astazarán García


M.C. Ciria C. Figueroa Soto

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves de material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial y total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del Director de tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director general

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mis tutores, familia y amistades, las cuales me ayudaron con su apoyo incondicional a ampliar mis conocimientos y alcanzar mis metas. Esto fue posible primero que nadie con la ayuda de Dios, gracias por otorgarme la sabiduría y la salud para lograrlo. Gracias a los intercambios y exposiciones de ideas con mis compañeros y amigos de estudios durante el proceso de la maestría. Quiero agradecer de manera especial a mi asesora Dra. Elisa Valenzuela Soto y a M.C Ciria Figueroa Soto, quienes fueron mi guía e inspiración para continuar en los momentos difíciles. A mis amigos, a mis padres y hermanos, en especial a mi prometida Aurora, quienes estuvieron a mi lado para darme fuerza. A todos ellos Dios los bendiga.

AGREDECIMIENTOS

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 abrirme sus puertas y permitirme cursar mis estudios en sus instalaciones.

Al departamento de ciencia de los alimentos, por aceptarme en su grupo y ayudarme a salir adelante. En especial a la Dra. Gabriela Ramos, Dra. Luz Vazquez, Dra. Mayra de la Torre y Dr. Ali Asaff.

Al laboratorio de proteínas de estrés, por aguantarme durante estos dos años y los que vienen. A la Dra. Elisa Valenzuela, M.C. Ciria Figueroa, Dr. Hector Ayala.

A mi familia, mis padres Alfredo y Alicia. Mis hermanos, Julio, Miguel, Pilar y Lupe María, por brindarme todo su cariño y apoyo.

A mi prometida Aurora, por estar a mi lado y ayudarme a levantarme en momentos difíciles, siempre manifestándome todo su amor.

A mis amigos con los que conviví durante la maestría y a los cuales los considero amigos para toda la vida. Oly, Chatela, Brody, Orlando, Denise, Mariana, Cony, Adriana, Johana, Sandra, Margarito, Bere, Ivan, Carme, José, Tere, Cipa, Chabelita, Alfonso, Erika, Lily, Daniel, Los Luises, Consuelo, Leslie, Faby, Noemi, Yuri, Brenda, Caballo y si me falta alguno, no se awiten.

A todos, muchas gracias

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
<i>Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo</i>	4
<i>Efecto del estrés oxidativo sobre las proteínas</i>	6
<i>Betaína aldehído deshidrogenasa</i>	7
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
CAPITULO I.....	15
El Peróxido de Hidrógeno es un Inhibidor de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa Renal.....	15
Resumen.....	15
Introducción.....	16
Materiales y métodos.....	17
Resultados y discusión.....	18
CAPITULO II.....	22
Estudios de Inhibición de la BADH por Peróxido de Hidrógeno.....	22
Resumen.....	22
Introducción.....	23
Materiales y métodos.....	24
Resultados y discusión.....	26
CAPITULO III.....	31
Análisis Cinético de la Inhibición de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de Riñón de Cerdo por Peróxido de Hidrógeno.....	31
Resumen.....	31
Introducción.....	32
Materiales y métodos.....	33

Resultados y discusión.....	34
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura tetramérica de betaina aldehído deshidrogenasa de bacalao.	8
Fig. 2 Subunidad de BADH representando sus dominios principales	10
Fig. 3 Interacción entre subunidades de la BADH.....	11
Fig. 4 Mecanismo de reacción de CSH y H ₂ O ₂ en solución.....	12
Fig. 5. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de BADH a pH 7.0 (A) y 8.0 (B)	20
Fig. 6 Mecanismo cinético de la BADH.	23
Fig. 7. Curva patrón de peróxido de hidrógeno.	27
Fig. 8. Gráfico de dobles recíprocos de la velocidad inicial de BADH para el sustrato NAD ⁺ a pH 8.0.	28
Fig. 9. Gráfico de dobles recíprocos de velocidad inicial de BADH para el sustrato BA a pH 8.0.	28
Fig. 10. Gráfico de dobles recíprocos de velocidad inicial de BADH para el sustrato NAD ⁺ a pH 8.0 en presencia de H ₂ O ₂	30
Fig. 11. Gráfico de dobles recíprocos de velocidad inicial de BADH para el sustrato BA a pH 8.0 en presencia de H ₂ O ₂	30
Fig. 12. Inhibición de la enzima BADH por el peróxido de hidrógeno a concentraciones saturantes de sustrato a pH 8.0.....	36
Fig. 13. Inhibición de la enzima BADH por el peróxido de hidrógeno a concentraciones subsaturantes de sustrato a pH 8.0	37
Fig. 14. Mecanismo cinético de BADH afectado por el peróxido de hidrógeno. ...	38
Fig. 15. Representación de los aminoácidos presentes en el sitio activo de BADH afectados por el peróxido de hidrógeno.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del pH sobre la inhibición causada por H ₂ O ₂ sobre la actividad de BADH a 25 y 37 °C.	21
Tabla 2. Efecto del peróxido de hidrógeno en los parámetros cinéticos de la BADH a concentraciones subsaturantes y saturantes de sustratos.....	40

RESUMEN

La enzima Betaína Aldehído Deshidrogenasa (BADH 1.2.1.8), forma parte de la familia de las aldehído deshidrogenasas clase 9 (ALDH9). En el riñón de cerdo, contribuye al mantenimiento de la osmoregulación del órgano, sintetizando el osmolito glicina betaína. La BADH puede verse afectada por cambios de temperatura y fuerza iónica, debido a que pierde su estabilidad y su forma estructural activa. El estrés oxidativo es el producto de la acumulación no controlada de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual modifica el ambiente en el que se encuentra la enzima. Existen estudios de ALDHs en los que se ha demostrado la pérdida de la actividad en presencia de ERO. En este trabajo, se analizó a través del mecanismo cinético de la enzima, los cambios provocados por el H_2O_2 a distintos pH y fuerza iónica. La eficiencia de la enzima disminuye en presencia de H_2O_2 0.1 mM. Se realizaron estudios de inhibición por H_2O_2 (0 - 0.2 mM) a pH 7.0 y 8.0 manteniendo fija, saturante o subsaturante la concentración de uno de los sustratos y variable la del otro. A pH 8.0 se encontró inhibición de tipo mixto para NAD^+ ($K_i = 108 \mu M$) y no competitivo respecto a BA ($K_i = 206 \mu M$). A pH 7.0 se encontró el mismo tipo de inhibición ($K_{iNAD} = 400 \mu M$, $K_{iBA} = 115 \mu M$). La fuerza iónica fisiológica no evitó la inhibición de BADH a pH 8.0, pero sí ligeramente a pH 7.0 (10%). La temperatura y el pH incrementaron el nivel de inhibición causado por peróxido (A 25 °C inhibió 50%, 50%, 47%, 44% y 37%, mientras que a 37 °C inhibió 52%, 70%, 75%, 91% y 93% a pH 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 y 8.0 respectivamente). Los datos generados sugieren que la BADH renal puede ser inhibida por peróxidos, comprometiendo la síntesis del osmolito glicina betaína, la cual es fundamental para el correcto funcionamiento del órgano.

INTRODUCCIÓN

A partir del descubrimiento de los radicales libres en la química a principios del siglo veinte, los conceptos de estrés oxidativo, daño oxidativo y antioxidantes fueron integrados al vocabulario científico. Actualmente, estos conceptos son utilizados indistintamente en algunos artículos y discusiones en diferentes áreas de investigación, con el objetivo de comprender la esencia, la distribución y las causas, dada la importancia de sus efectos sobre la salud (Kohen y Nyska, 2002).

En el metabolismo celular, se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) bajo condiciones normales, de manera que la proporción de formación de dichas especies está equilibrada con la cantidad eliminada por los antioxidantes. Sin embargo, cuando se altera este balance se favorecen las condiciones para generar el estrés oxidativo y provocar el daño celular (Touyz, 2004).

El estrés oxidativo provoca daño fisiológico en el organismo, causado por la acumulación de ERO (Martin y Goeddeke-Merickel, 2005). Las ERO son metabolitos muy reactivos, generados de manera exógena o endógena y han demostrado ser capaces de dañar al ADN, promover la peroxidación de lípidos en membranas y modificar irreversiblemente las proteínas (Gutiérrez, 2002). Dicho efecto tiene una relación directa en la aparición de enfermedades como hipertensión, diabetes, disfunción renal (Bayraktutan, 2002; Evans y Halliwell, 1999) y otras patologías neurodegenerativas (Warner, *et al.*, 2004).

Aunque se conoce el efecto de las especies reactivas sobre algunas proteínas, aún faltan por estudiar otras que desempeñan un papel importante en la función de órganos específicos. Tal es el caso de las enzimas pertenecientes a la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), de cuya afectación por el estrés oxidativo se conoce poco (Dalber, *et al.*, 2004; Ohsawa, *et al.*, 2003; Ohta, *et al.*, 2004; Parker, 2004).

Las ALDHs catalizan la oxidación irreversible de una amplia gama de aldehídos a sus correspondientes ácidos (Johansson, *et al.*, 1998). La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza el último paso de la síntesis irreversible de glicina betaína, sustancia cuya función es actuar como osmoprotector sin alterar las funciones celulares (Falkenberg y Strom, 1990; Mori, *et al.*, 1992; Nagasawa, *et al.*, 1976; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Weretilnyk y Hanson, 1989).

En la literatura reciente se discuten las causas del estrés oxidativo en función de los principales metabolitos que generan el daño oxidativo (Beckman y Ames, 1998; Kohen y Nyska, 2002; Locatelli, *et al.*, 2003). En los últimos años se ha encontrado evidencia de que las especies reactivas de oxígeno, a bajas concentraciones, favorecen algunas reacciones fisiológicas, regulan el metabolismo, y además, pueden ser utilizadas clínicamente, rompiendo esquemas e hipótesis establecidas (Voeikov, 2006). La mayor parte de las publicaciones sobre el tema tienen un enfoque clínico, por lo cual sólo señalan las enfermedades que el estrés oxidativo induce. Sin embargo, no profundizan en las rutas metabólicas ni en los cambios que sufren las proteínas involucradas en la aparición de enfermedades.

El estudio del mecanismo cinético de la betaína aldehído deshidrogenasa, proteína de gran importancia para la homeostasis de las células renales, es un buen modelo para tratar de comprender el mecanismo de acción de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas con actividad enzimática. Por ello, en este trabajo se evaluaron las constantes cinéticas de BADH en presencia del peróxido de hidrógeno como inductor del estrés oxidativo bajo distintas condiciones, así como el tipo de inhibición que provoca en ésta.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Una molécula puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Así mismo, los radicales libres también pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo de cada especie formada. Como consecuencia de sus electrones desapareados, éstas son extremadamente reactivas; por lo tanto, tienen una vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Martínez-Cayuela, 1998).

En general, las ERO son sustancias prooxidantes y pueden ser clasificadas en dos grupos: especies radicales y no radicales. Los radicales engloban al oxígeno (biradical) (O_2), óxido nítrico (NO), anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH), peroxilo (ROO) y alcoxilo (RO), y contienen, al menos, un electrón desapareado. Son especies muy reactivas por su propensión a donar u obtener otro electrón para mantener su estabilidad. Entre las especies no radicales, se encuentran el ácido hipocloroso (HClO), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los peróxidos orgánicos (ROOH), el ozono (O_3), los aldehídos (HCOR) y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). A pesar de no ser radicales en sí, se toman en cuenta ya que participan en las reacciones que elevan la concentración de los agentes prooxidantes (Kohen y Nyska, 2002).

El exceso de las especies reactivas da como resultado un daño celular al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Gutiérrez, 2002). Dicho estrés se debe a la exposición de la materia viva a diversas fuentes, que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes. La pérdida del balance en estos sistemas de defensa, puede ser el resultado de un déficit de los compuestos antioxidantes, o también, de un incremento exagerado en la producción de ERO (Gutiérrez, 2002).

Desde el punto de vista molecular, las especies reactivas de oxígeno son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos. Entre las principales rutas para su generación, están la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, la hiperosmolaridad y las reacciones de oxidación. Además, el incremento de ERO en el organismo se puede producir por factores exógenos, tales como las radiaciones gamma y ultravioleta, el ultrasonido, los alimentos, los fármacos, los contaminantes, los xenobióticos y las toxinas. También inducen dicho incremento los factores endógenos, como el metabolismo, las enzimas productoras de ERO y las enfermedades.

Un organelo en el cual se generan las ERO es la mitocondria, cuyo papel es la producción de energía mediante la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno. Para lograrlo, lleva a cabo el flujo de electrones a través de una serie de complejos, a este proceso se le llama cadena de transporte de electrones. El aceptor final de electrones es el oxígeno molecular, el cual es reducido hasta agua. Sin embargo, durante este proceso algunos electrones pueden escapar y dar lugar a una reducción incompleta del oxígeno, formando el anión superóxido (O_2^-). Se estima que un máximo del 1% del oxígeno que se consume puede terminar en la formación de ERO. Cuando los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos han sido superados por la cantidad de especies reactivas, puede ocurrir el daño oxidativo y la muerte celular (Fariss, *et al.*, 2005).

Para contrarrestar los efectos negativos de las ERO producidas en el cuerpo, los mecanismos de defensa han evolucionado para detoxificar estos radicales. Dichos mecanismos consisten en enzimas, la mayoría de ellas intracelulares, y antioxidantes de bajo peso molecular. Estos últimos, se localizan dentro y fuera de la célula, y provienen del consumo de frutas y vegetales dietarios, así como de su síntesis en las células (Evans y Halliwell, 1999).

Dentro de las enzimas con actividad antioxidante en mamíferos, se encuentra la superóxido dismutasa. Su función es acelerar la conversión de O_2^- en H_2O_2 . El peróxido producido es eliminado por la glutatión peroxidasa

y la catalasa, que lo convierten en H₂O y O₂. Algunas otras enzimas pueden estar involucradas en la reducción de compuestos oxidados (GSH reductasa, deshidroascorbato reductasa) ó ser responsables del mantenimiento de los grupos tiol de las proteínas (tioredoxina reductasa) (Ahsan, *et al.*, 2003). También tienen esta función los compuestos hidrofílicos, como el glutatión, el ácido ascórbico y la urea, así como algunos lipofílicos (tocoferol, flavonoides, carotenoides y ubiquinol) que mantienen un ambiente reductor, difieren no sólo entre un organismo o tejido, sino también entre compartimientos celulares (Beckman y Ames, 1998).

A pesar de lo anteriormente expuesto, el equilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes no es perfecto, ocasionando inevitablemente el daño oxidativo. En los últimos años, el estrés oxidativo ha sido implicado en una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Entre los más importantes están la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, que afectan el sistema nervioso central (Valko, *et al.*, 2007). También está implicado en el infarto del miocardio e hipertensión, alterando el sistema cardiovascular y otros que involucran el sistema respiratorio, digestivo y osteomioarticular (Touyz, 2004). En conjunto con el proceso de envejecimiento, el estrés oxidativo puede acelerar la degradación del organismo, por ello el gran interés en su estudio con el fin de tener más alternativas terapéuticas (Pérez-Pérez, 2000).

Efecto del estrés oxidativo sobre las proteínas

La oxidación de proteínas es definida como la modificación covalente inducida por la presencia de especies reactivas de oxígeno o indirectamente, por la interacción con productos secundarios del estrés oxidativo. Debido a la variedad de mecanismos que pueden inducir las modificaciones y la alteración de las cadenas laterales de aminoácidos, el número de opciones para la oxidación de proteínas se multiplica (Shacter, 2000).

Las proteínas son modificadas de diferente manera por especies reactivas de oxígeno, ya sea a través de sus instauraciones o modificaciones aminoacídicas en aquéllas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisterna (Shacter, 2000). Estas alteraciones provocan cambios estructurales por entrecruzamiento y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares. Estos cambios en las conformaciones estructurales se ven reflejados en la pérdida de función de la proteína (Martínez-Cayuela, 1998).

El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja. Entre las especies más deletéreas, se incluyen radicales de rápida propagación como el alcoxilo (Evans y Halliwell, 1999). A partir de las proteínas oxidadas, se generan algunos productos como los hidroperóxidos proteicos, que son relativamente estables y pueden generar nuevos radicales al reaccionar con metales de transición (Gleseg, *et al.*, 2000). Los residuos de aminoácidos azufrados, como la lisina y la histidina, suelen ser más susceptibles al daño oxidativo (Shacter, 2000). En los primeros, se generan disulfuros que pueden inducir la formación de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades, con formación de agregados (Gutiérrez, 2002). En los segundos, se produce su oxidación a grupos aldehídos, lo cual también puede ocurrir con residuos de aspártico, prolina y arginina. Esto da lugar a un incremento de grupos carbonilo en las proteínas blanco. En los casos extremos llega a producirse incluso la fragmentación de las cadenas polipeptídicas (Vicedo y Vicedo, 2000).

Betaina aldehído deshidrogenasa

Las enzimas son proteínas catalíticas muy específicas, que aceleran la velocidad de una reacción mediante la reducción de la energía de activación (Copeland, 2000). En el riñón se encuentra la enzima betaina aldehído deshidrogenasa, enzima con una función muy importante en la homeostasis celular (Figueroa-Soto, *et al.*, 1999).

El riñón es un órgano encargado de eliminar del cuerpo sustancias de desecho que se han ingerido o se han producido en el metabolismo (Coresh, *et al.*, 2003). Una segunda función, que es especialmente decisiva, es la regulación del volumen y la composición de los líquidos corporales (Kultz, 2004). Por lo que respecta al agua, y prácticamente a todos los electrolitos del cuerpo, el equilibrio entre los ingresos y las pérdidas se mantiene en gran parte a través de la adecuada función de los riñones. Esta función reguladora mantiene el ambiente estable que todas las células necesitan para llevar a cabo sus diversas actividades (Guyton, 1992).

La BADH de riñón activa es un homotetrámero de 232 kDa (Fig.1) que muestra preferencia por el NAD^+ como coenzima y es muy específica para betaína aldehído como sustrato (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000). Se ha estudiado el efecto que los cationes monovalentes tienen sobre su actividad, estabilidad y termoestabilidad, encontrándose que la BADH de riñón requiere de K^+ para mantener la estabilidad de la forma tetramérica activa (Valenzuela-Soto, *et al.*, 2005; Valenzuela-Soto, *et al.*, 2003).

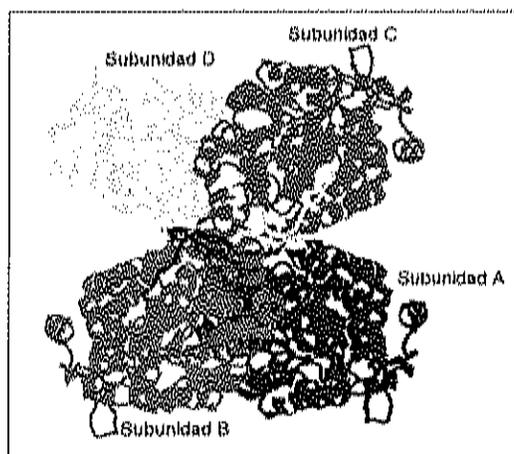


Figura 1. Estructura tetramérica de betaína aldehído deshidrogenasa de bacalao (Johansson, *et al.*, 1998).

La estructura tetramérica conocida como estado nativo ("folded state"), define el sitio activo de la macromolécula, y es la única relevante desde el punto de vista biológico. Solamente cuando se encuentra en su estructura terciaria, la proteína es capaz de realizar las diversas funciones bioquímicas para las cuales fue diseñada. De este modo, el problema del plegamiento de una proteína consiste en determinar los mecanismos físicos y químicos que le permiten a la cadena de aminoácidos adquirir una estructura tridimensional específica (Olivares-Quiroz y Scherer, 2004).

La mayoría de las células capaces de adaptarse a altas concentraciones de sales logran equilibrar la osmolaridad extracelular al aumentar las concentraciones intracelulares de ciertas sustancias orgánicas (Yancey, 2005). Una de estas sustancias es la glicina betaína, un osmolito y osmoprotector (no tóxico) que se acumula dentro de la célula cuando se encuentra bajo estrés osmótico (García-Pérez y Burg, 1991). Además, se ha observado que muchas plantas, bacterias y animales acumulan glicina betaína, no sólo al estar en estrés salino, sino también bajo condiciones de estrés hídrico (Yancey, *et al.*, 1982).

En algunos microorganismos como *Xanthomonas translucens* y *Pseudomonas aeruginosa*, la enzima BADH tiene un papel como intermediario en la catálisis de los precursores del osmolito glicina betaína (Muñoz-Clares y Mujica-Jiménez, 2001). Este efecto le da una mayor importancia a la actividad de la enzima, como proteína clave para la protección osmótica de la célula (González-Segura, *et al.*, 2005).

Las especies de la familia de aldehído deshidrogenasas que se han estudiado presentan algunas diferencias, en cuanto a estructura. La variabilidad en su estructura cuaternaria y en el tamaño de sus subunidades se debe a la gran diversidad de enzimas existentes (Julián-Sánchez, *et al.*, 2007); sin embargo, son muy similares en la forma de plegarse. De este modo, pueden distinguirse tres dominios en la subunidad: el dominio de unión de la coenzima, el catalítico y el de oligomerización (Johansson, *et al.*, 1998) (Fig. 2).

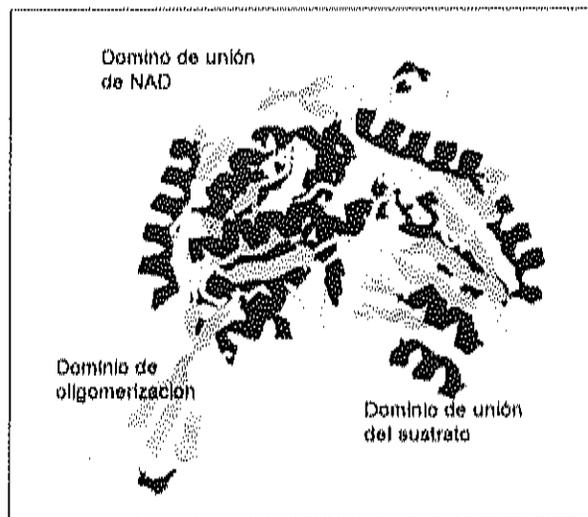


Figura 2. Subunidad de BADH representando sus dominios principales (Johansson, et al., 1998).

El tetrámero se forma de dos dímeros que interactúan en sus lados opuestos al sitio de unión de la coenzima. Ambos dominios de oligomerización del dímero forman puentes de hidrógeno con las partes correspondientes del dímero vecino. Entre los residuos de cisteína que se encuentran en el homotetrámero de BADH, hay cuatro conservados en cada subunidad: Cys286, 353, 377 y 439. En un modelo tridimensional, puede observarse que la Cys439 está localizada en la interfase monómero – monómero de los pares diméricos (Johansson, *et al.*, 1998) (Fig. 3). Esto resalta la importancia de este residuo para el mantenimiento de la estructura tetramérica nativa. Además, puede interactuar formando puentes de hidrógeno con el residuo de lisina de la subunidad vecina, ya que este residuo también se ha conservado en todas las BADHs y ALDHs secuenciadas hasta ahora (Gonzalez-Segura, *et al.*, 2005).

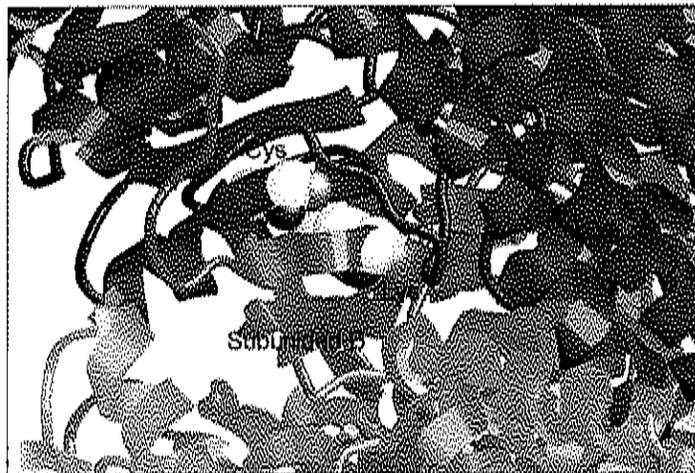


Figura 3. Interacción entre subunidades de BADH (Johansson, *et al.*, 1998).

La secuencia de la enzima BADH de riñón aún no se conoce por completo. Sin embargo, secuencias internas de la proteína mostraron una gran homología con las aldehído deshidrogenasas clase 9. Análisis estructurales de otras aldehído deshidrogenasas, como la ALDH1 y ALDH3, han mostrado estructuras cuaternarias similares, a pesar de poseer una homología menor al 40% en sus secuencias. En las secuencias conservadas, los residuos de cisteína tienen un papel importante en el sitio activo. Los aminoácidos como aspartato, serina, lisina y arginina están implicados en la estabilidad de los dímeros y tetrámeros (Gonzalez-Segura, *et al.*, 2005; Ki Ho y Weiner, 2007; Rodriguez-Zavala y Weiner, 2002).

El peróxido de hidrógeno, una de las especies reactivas de oxígeno, es una molécula relativamente estable y capaz de difundir a través de las membranas (Coyle, *et al.*, 2006); de tal manera que puede atacar a las proteínas y tener un efecto directo sobre la estructura de la BADH. Si el peróxido de hidrógeno es capaz de modificar a la cisteína presente en el sitio activo (CSH), como lo indica el mecanismo propuesto por Luo y Anderson (2006) (Fig. 4), entonces impediría la unión del sustrato y por lo tanto, la catálisis. De igual forma, si el peróxido induce que la enzima pierda su forma activa (homotetrámero) desplegándose a dímeros o monómeros, la BADH podría reducir o perder su actividad.

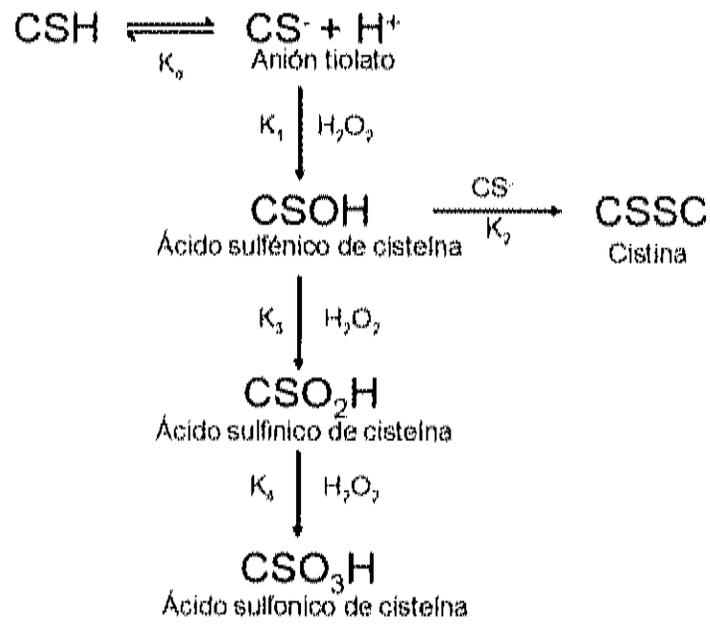


Figura 4. Mecanismo de reacción de CSH y H₂O₂ en solución (Luo y Anderson, 2006).

HIPÓTESIS

El estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno en el riñón de cerdo, inhibe la actividad y modifica los parámetros cinéticos de la enzima BADH, lo cual es modulado por fuerza iónica y pH del medio.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto del estrés oxidativo sobre las constantes cinéticas y la actividad de la betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar el peróxido de hidrógeno presente en el riñón.
- Analizar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la enzima.
- Estudiar el efecto de la fuerza iónica respecto al peróxido de hidrógeno en la actividad enzimática.
- Estudiar los efectos del pH y la temperatura, en combinación con el peróxido de hidrógeno, en la actividad de la BADH.
- Determinar los cambios en las constantes cinéticas $K_{m_{BA}}$, $K_{m_{NAD^+}}$, K_{ib} y V_{max} de la enzima provocados por el peróxido de hidrógeno.
- Establecer el tipo de inhibición provocada por el peróxido de hidrógeno.

CAPITULO I

El Peróxido de Hidrógeno es un Inhibidor de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa Renal

Resumen

La betaína aldehído deshidrogenada de riñón de cerdo cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído a glicina betaína, un osmolito y osmoprotector que se acumula en las células de la medula renal. Se utilizó peróxido de hidrógeno (0 a 1 mM) para provocar estrés oxidativo en el medio ambiente de la BADH in vitro. El efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la BADH fue analizado a 5 valores de pH (6.8-8.0), a 25°C y 37°C, y bajo condiciones de fuerza iónica baja y fisiológica. La actividad de la enzima se redujo al tiempo que se incrementó la concentración de peróxido. A las dos temperaturas probadas, más del 50% de la actividad de la enzima se perdió a 100 μ M de peróxido. La fuerza iónica tuvo poco efecto protector sobre la actividad enzimática en presencia de peróxido a pH 8.0; sin embargo, a pH 7.0 se protegió un 10% la actividad. A pH por abajo del óptimo (pH 8.0), el efecto inhibitor del peróxido se incrementó a las dos temperaturas analizadas.

Introducción

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas en el metabolismo celular bajo condiciones normales, principalmente a través de las reacciones de oxidación y la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. La cantidad de estas ERO producidas se encuentra equilibrada por la cantidad que es eliminada por los antioxidantes. Sin embargo, se ha propuesto que las condiciones hiperosmóticas, como las que se encuentran en las células de la médula renal, incrementan la cantidad de ERO (Kultz, 2004; Zhang, *et al.*, 2004). Jin, *et al.*, (2006) encontraron que los cambios estructurales y fisiológicos dañinos en el riñón son provocados por las ERO generadas por la NADPH oxidasa. Sin embargo, no existe aún certeza sobre los mecanismos que producen estas ERO.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las moléculas más estables entre las ERO, capaz de pasar a través de las membranas, causando daño a los componentes celulares (Evans y Halliwell, 1999). En general, puede modificar todos los residuos de aminoácidos que conforman a una proteína, empero algunos de ellos son más susceptibles a sufrir alteraciones. Por otra parte, las ERO han sido propuestas como segundos mensajeros del estrés ambiental (Reth, 2002). Puesto que las condiciones hiperosmóticas han sido propuestas como generadoras de ERO, se ha vuelto de mayor importancia el estudio de su efecto sobre las enzimas involucradas en la síntesis de osmolitos (Kultz, 2004; Zhang, *et al.*, 2004). Una de estas enzimas es la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH).

Esta enzima pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH9) (Vasiliou, *et al.*, 1999), y cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído (BA) a glicina betaína (GB) dependiente de NAD^+ . GB es un osmolito compatible, sintetizado y acumulado a altas concentraciones en las células de la médula renal (Guzman-Partida y

Valenzuela-Soto, 1998; Moeckel y Lien, 1997). Además, a la GB se le ha descrito como un osmoprotector contra el efecto deletéreo de la urea (Burg, *et al.*, 1996). De tal forma que si el peróxido de hidrógeno, como una de las ERO más estables, afecta las funciones de la BADH en el riñón, además de reducir la concentración de osmolitos en el órgano, podría incrementar el riesgo de una disfunción renal.

En trabajos previos con la BADH renal, se determinó que la fuerza iónica es importante para el mantenimiento de la estabilidad y termoestabilidad de la estructura cuaternaria (Valenzuela-Soto, *et al.*, 2005; Valenzuela-Soto, *et al.*, 2003). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de BADH y los papeles que desempeñan la fuerza iónica fisiológica (KCl 0.15 M), el pH y la temperatura, sobre este efecto.

Materiales y métodos

Materiales

La betaína aldehído, el NAD⁺, el HEPES y el peróxido de hidrógeno utilizados en los ensayos fueron adquiridos de SIGMA. El resto de los reactivos utilizados se obtuvieron a través de proveedores estándar.

Purificación de la enzima BADH y ensayo de actividad

La enzima BADH fue purificada del riñón de cerdo y el ensayo de actividad se realizó a 30 °C como fue reportado previamente (Guzman-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). La enzima pura fue almacenada a -20 °C en 10 mM fosfato de potasio, pH 7.0, 1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol, 0.2 M KCl y 10% glicerol. La enzima (0.15 mg/mL) se dializó toda la noche a 4 °C contra 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, 1 mM EDTA, 10 mM β-

mercaptoetanol (Buffer A, baja fuerza iónica), y contra buffer A más 150 mM KCl (Buffer B, fuerza iónica fisiológica).

Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno en la actividad de BADH

El H_2O_2 , en un rango de concentración de 0 a 1 mM, fue agregado al buffer de actividad de BADH a pH 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 u 8.0. Luego se agregó la enzima dializada y se midió su actividad a 25 °C y 37 °C. Las velocidades de reacción fueron lineales durante los primeros 3 min del ensayo. Cada determinación se realizó al menos por duplicado.

Análisis de datos

Los datos de actividad fueron analizados por regresión no lineal, utilizando el programa Microcal Origin (OriginLab Corporation).

Resultados y discusión

Efecto de la concentración del H_2O_2 sobre la actividad de BADH

La actividad enzimática medida a pH 8.0 y 25°C disminuyó considerablemente a lo largo del rango de concentraciones probadas de peróxido de hidrógeno. Bajo estas condiciones y a una baja fuerza iónica, la actividad de BADH decayó 37% con 0.1 mM H_2O_2 , mientras que bajo condiciones de fuerza iónica fisiológica, disminuyó hasta un 43% (Fig. 5A). El ensayo con peróxido de hidrógeno se repitió a 37 °C y pH 8.0. Encontrando que a baja fuerza iónica, la actividad de BADH bajó un 50% a 0.1 mM H_2O_2 , en contraste, a condiciones fisiológicas de fuerza iónica llegó hasta un 55% (Fig. 5B). Es decir, la temperatura incrementó el nivel de inhibición causado por el peróxido de hidrógeno.

Con la finalidad de investigar cómo la BADH se ve afectada por el peróxido a pH fisiológico, se realizaron ensayos a pH 7.0. A 25 °C, la enzima perdió 48% y 40% de su actividad a condiciones de fuerza iónica baja y fisiológica, respectivamente (Fig. 5B). Mientras que a una temperatura de 37 °C, se encontró un decremento de la actividad enzimática de 52% y 42% bajo condiciones de fuerza iónica baja y fisiológica, respectivamente.

Debido a que se ha descrito que el peróxido de hidrógeno puede disociarse a radical hidroxilo al ganar un electrón, y que esta molécula es tan activa que puede tomar un átomo de hidrógeno prácticamente de cualquier otra molécula dependiendo de su estado de ionización (Voelkov, 2006). Se evaluó el efecto del pH a un intervalo de 6.8 a 8.0 en el medio de ensayo sobre la actividad de BADH, agregando 0.1 mM H₂O₂. Se encontró que la inhibición de la BADH por peróxido de hidrógeno a 25 °C se incrementó al aumentar el pH: a baja fuerza iónica, la actividad enzimática disminuyó 50%, 50%, 47%, 44% y 37% a pH 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 y 8.0, respectivamente (Tabla 1).

La presencia de iones monovalentes no protegió la inhibición de la actividad de la enzima BADH frente al peróxido de hidrógeno a pH 8.0 y 37 °C; sin embargo, bajo las condiciones fisiológicas a pH 7.0 y 37 °C, se presentó un ligero efecto protector (10%). Estos resultados fueron inesperados, debido a que estudios previos con BADH renal demostraron que la inactivación por urea pudo ser prevenida por la fuerza iónica (Ayala-Castro y Valenzuela-Soto, 2007). Los resultados de este trabajo muestran que el estrés oxidativo es más deletéreo para la actividad de BADH que el estrés osmótico causado por urea.

Las células de la médula renal se encuentran rodeadas por un ambiente hiperosmótico debido al mecanismo concentrador de orina (Kwon, *et al.*, 1996), y hay evidencia que sugiere que las células medulares se encuentran normalmente bajo estrés oxidativo (Zhang, *et al.*, 2004). Sin embargo, las células medulares deben tener un mecanismo para evadir el efecto deletéreo de las ERO *in vivo*. La glicina betaina y la glicerolfosocolina son buenas candidatas para contrarrestar el daño ocasionado.

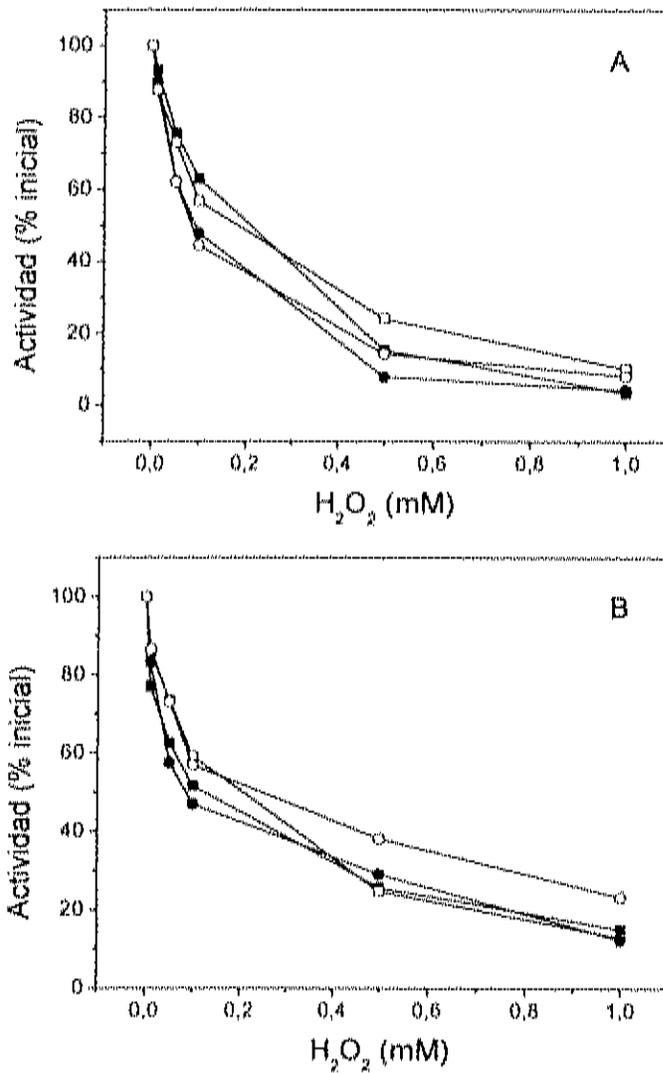


Figura 5. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de BADH a pH 8.0 (A) y 7.0 (B). La actividad de BADH fue evaluada en presencia de 0.1 mM de peróxido de hidrógeno a 37 °C a fuerza iónica baja (●) o fisiológica (○), y a 25 °C a fuerza iónica baja (■) y fisiológica (□).

Tabla 1. Efecto del pH sobre la inhibición causada por H₂O₂ sobre la actividad de BADH a 25 y 37 °C

Actividad (% control) ^a				
pH	25 °C		37 °C	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
8.0	100	63	100	48
7.4	68	37	74	30
7.2	47	22	58	25
7.0	26	13	18	9
6.8	18	9	12	7

^aLa actividad enzimática a pH 8.0 y 25 °C fue considerada como la actividad control

CAPITULO II

Estudios de Inhibición de la BADH por Peróxido de Hidrógeno

Resumen

La presencia estable de la actividad de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH EC 1.2.1.8) en el riñón de los mamíferos es primordial para el mantenimiento adecuado de la concentración del osmolito glicina betaína en el órgano. La síntesis de éste osmolito puede verse comprometida por el estrés oxidativo. En este trabajo, se realizaron ensayos de patrones de velocidad de la enzima BADH de riñón de cerdo frente a 0.1 mM H₂O₂. Los resultados indicaron que la eficiencia de la enzima al pH óptimo de $V_{max} = 2.9 \pm 0.10$ μ moles/min/mg disminuyó por efecto del estrés oxidativo al reducir su eficiencia en un 40 % ($V_{max} = 1.73 \pm 0.09$ μ moles/min/mg). También, se encontraron cambios en las constantes de afinidad de unión de sustratos ($Km_{NAD} = 58.4 \pm 7.5$ μ M, $Km_{BA} = 109 \pm 11$ μ M). Al adicionar H₂O₂ al medio de ensayo, se encontró un incremento aparente en la afinidad de unión de los sustratos ($Km_{NAD} = 29 \pm 7$ μ M, $Km_{BA} = 85 \pm 8$ μ M). Cuando se determinó la constante de disociación ($K_{ia} = 49 \pm 10$ μ M) al agregar peróxido, el valor cambió a 26.2 ± 4.5 μ M.

Introducción

El mecanismo cinético de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa renal es Iso Bi Bi Ordenado (Fig. 6). Esto implica que el orden en el cual se unen los sustratos a la enzima y se liberan los productos de la reacción tiene una secuencia específica. En este mecanismo, el NAD^+ es el primer sustrato que se une a la enzima, y el NADH es el último producto liberado. El segundo sustrato es el compuesto betaína aldehído (BA), el cual es transformado al osmolito glicina betaína (GB) y su liberación es irreversible. Dentro de este mecanismo, se presenta inhibición por el sustrato BA (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

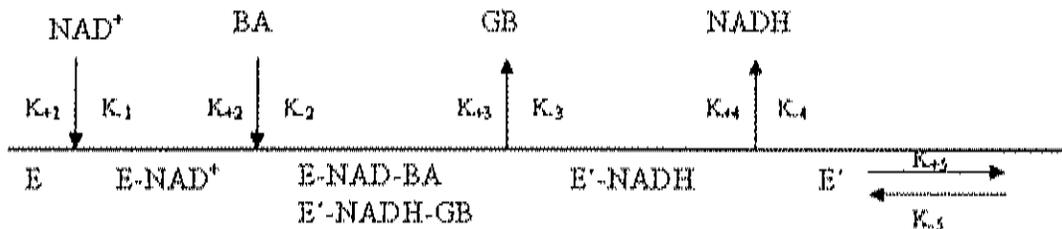


Figura 6. Mecanismo cinético de la BADH.

La enzima BADH tiene muy alta especificidad por el sustrato betaína aldehído. Sin embargo, puede utilizar otros sustratos como acetaldehído, butiraldehído y gliceraldehído, con una menor afinidad (Guzman-Partida y Valenzuela-Soto, 1998).

Es importante determinar los parámetros cinéticos de la BADH cuando se encuentra en sus condiciones óptimas. Esto permite identificar la eficiencia de la enzima (V_{max}) y la afinidad que tiene para unir a los diferentes sustratos (K_m). En contraste, cuando la enzima se encuentra bajo condiciones desfavorables o en presencia de inhibidores que pueden alterar

su función catalítica, se detectan cambios en sus parámetros cinéticos (Segel, 1976).

El valor de K_m , equivalente a la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de la enzima, varía considerablemente de una enzima a otra. Los cambios que ocurren en la K_m bajo distintas condiciones pueden atribuirse a cambios en la estabilidad del complejo enzima sustrato (Copeland, 2000).

La actividad de la enzima BADH se encuentra localizada en el citoplasma. No obstante, se ha demostrado que la enzima está en la mitocondria en hígado de rata (Chern y Pietruszko, 1999) y en el riñón de cerdo, donde bajo condiciones fisiológicas puede estar inhibida por las altas concentraciones de NADH (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Es de vital importancia que la BADH se encuentre en su forma activa, para el mantenimiento de la concentración de osmolitos. Por ello, en este trabajo, se evaluaron los cambios en las constantes cinéticas de BADH (V_{max} y K_m) en condiciones de estrés oxidativo, con la finalidad de conocer el efecto de estas condiciones sobre la funcionalidad de la proteína.

Materiales y métodos

Cuantificación de H_2O_2 en riñón de cerdo

La cuantificación espectrofotométrica del peróxido de hidrógeno en el riñón de cerdo, el cual fue obtenido de rastro tipo inspección federal (TIF), fue realizada modificando la técnica de rojo de fenol según (Messner y Boll, 1994), adicionando SDS al 10% al inicio del ensayo para eliminar el exceso de lípidos y proteínas.

Purificación de la enzima

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo fue purificada según la metodología propuesta por (Guzman-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). La actividad específica final de la enzima utilizada fue 2.5 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína a 25 °C, utilizando 0.1 M HEPES-KOH, pH 8.0, 0.5 mM BA, 0.1 mM NAD^+ .

Ensayo de actividad enzimática

Se utilizaron concentraciones variables y fija-variables de los sustratos NAD^+ y BA en sus correspondientes ensayos. Agregando una concentración de 0.1 mM peróxido de hidrógeno en el medio de ensayo. Cada unidad de actividad es equivalente a 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ de NADH formado.

Análisis de datos

Los datos cinéticos fueron analizados en dos pasos. Primero, los datos experimentales a concentraciones fijas de un sustrato y variando la concentración del otro sustrato fueron graficadas según la ecuación de Michaelis-Menten (Ec.1), realizando un análisis de regresión no lineal con la ayuda del programa Leatherbarrow, R. J. Grafit 4.0 (Erithacus Software Ltd., Staines, UK). El segundo paso es graficar las constantes cinéticas aparentes obtenidas (Ecs. 2 y 3) a la ecuación de Lineweaver-Burk (Ec. 4), para obtener los valores de K_m y V_{max} .

$$v = \frac{V_{app}[A]}{K_{m_{app}} + [A]} \quad \text{Ec.1}$$

$$V_{app(1/n)} = \frac{V[A]}{K_n} + [A] \quad \text{Ec. 2}$$

$$V_{app(1/A)} = \frac{V[B]}{K_b + [B]} \quad \text{Ec. 3}$$

$$y = \frac{1}{V_{max}} + \frac{S * K_m}{V_{max}} \quad \text{Ec.4}$$

En donde v es la velocidad máxima; A y B son las concentraciones de los dos sustratos; K_a y K_b son las constantes de Michaelis-Menten para los sustratos A y B. K_{1a} es la constante de disociación para el sustrato A.

Resultados y discusión

Concentración de H_2O_2 en el riñón de cerdo

Se analizó la concentración de peróxido de hidrógeno en el riñón de cerdo con la finalidad de obtener un valor de referencia de los niveles de peróxido de hidrógeno en el órgano. Se realizó el ensayo con el extracto obtenido bajo las condiciones estándar, utilizadas para la purificación de la enzima BADH.

La concentración de H_2O_2 en el extracto se calculó haciendo uso de una curva patrón (Fig. 7), la cual permite conocer la concentración correspondiente a la absorbancia obtenida en el ensayo.

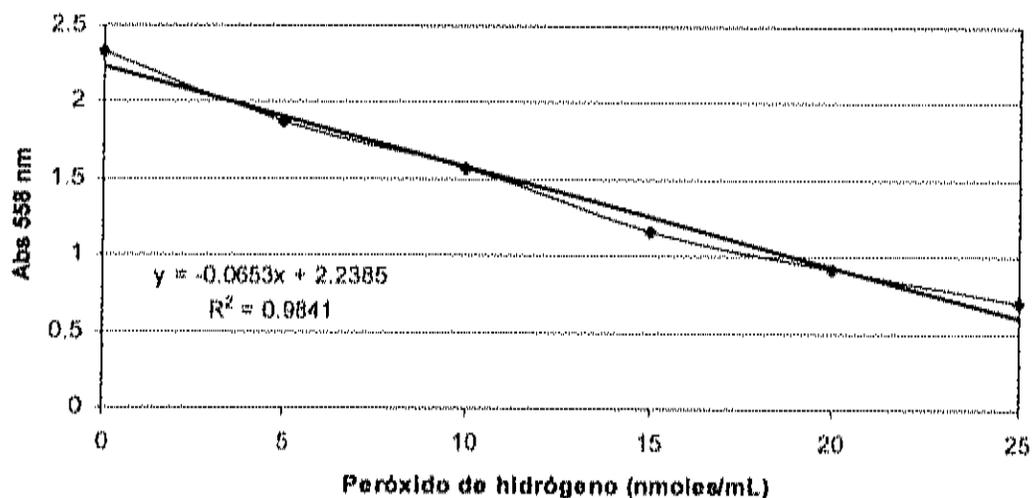


Figura 7. Curva patrón de peróxido de hidrógeno.

La concentración de H_2O_2 en el órgano fue de aproximadamente 0.01 mM. Este valor está sujeto a las variaciones que se detectan al trabajar con muestras biológicas. El hecho de que la concentración determinada fuera muy baja, parece indicar que el órgano estaba en buen estado, libre de estrés, puesto que en tejidos dañados, los niveles de peróxido de hidrógeno exceden 0.1 mM (Coyle, *et al.*, 2006).

Patrones de velocidad inicial de la BADH en presencia de 0.1 mM H_2O_2

Se determinaron los patrones de velocidad inicial en presencia de concentraciones variables y fijas variables de los sustratos (0.05 – 0.5 mM), con la finalidad de tener un control previo a la adición de peróxido de hidrógeno en el medio de ensayo. En las figuras 8 y 9, se muestran tanto la gráfica de Lineweaver-Burk como los regráficos de pendientes e interceptos obtenidos al pH óptimo de la enzima. La velocidad máxima obtenida fue de 2.9266 ± 0.1126 μ moles/min/mg de proteína. La enzima BADH presenta distinta afinidad de unión para cada uno de los sustratos, uniendo con mayor afinidad al NAD^+ ($K_m = 58.4 \pm 7.5$ μ M) y en menor grado a BA ($K_m = 109 \pm 11$ μ M).

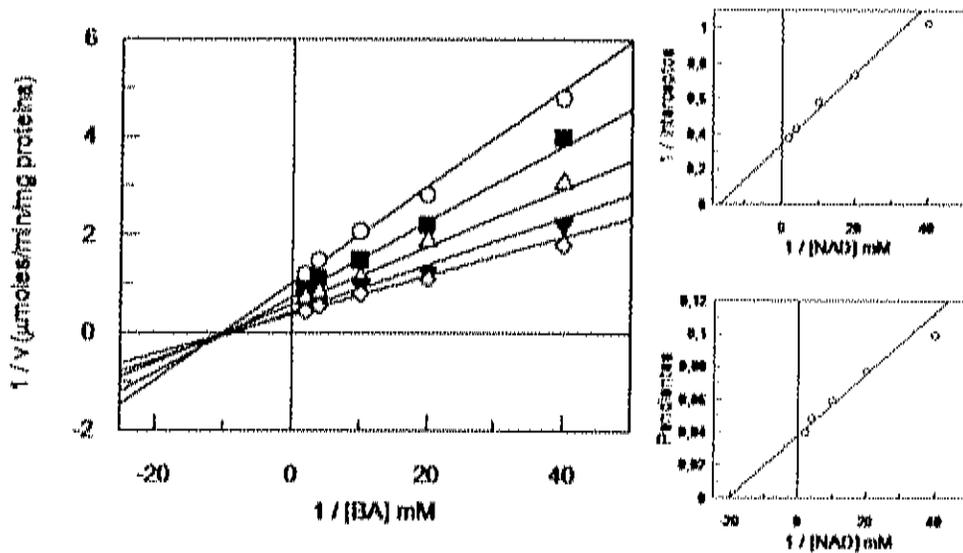


Figura 8. Gráfico de dobles recíprocos de la velocidad inicial de BADH para el sustrato NAD⁺ a pH 8.0. Se variaron las concentraciones de BA en concentraciones fijas de NAD⁺ (○) 0.025, (■) 0.05, (△) 0.1, (▼) 0.25 (◇) 0.5 mM. Cada punto experimental representa la media de 3 ensayos.

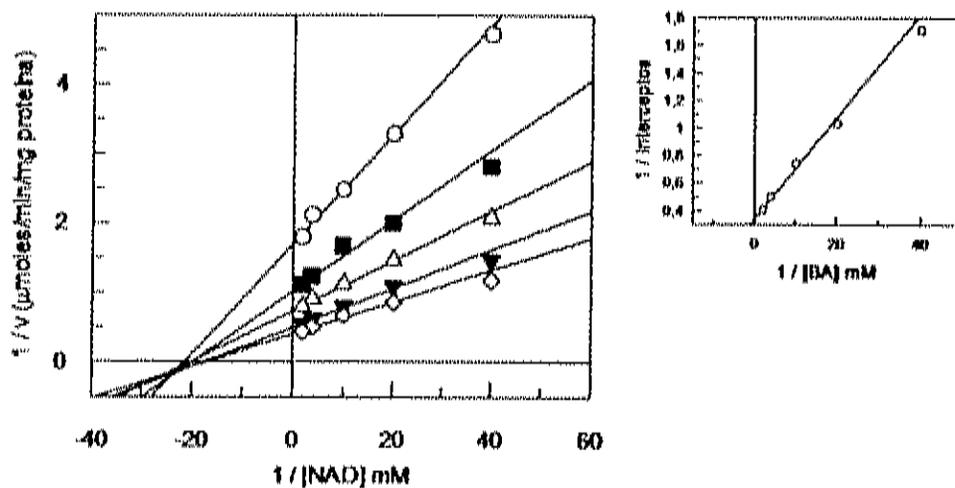


Figura 9. Gráfico de dobles recíprocos de velocidad inicial de BADH para el sustrato BA a pH 8.0. Se variaron las concentraciones de NAD⁺ en concentraciones fijas de BA (○) 0.025, (■) 0.05, (△) 0.1, (▼) 0.25 (◇) 0.5 mM. Cada punto experimental representa la media de 3 ensayos.

Además, se analizó la constante de la formación del complejo enzima sustrato (K_{ia}), para compararlo con la afinidad de unión de BADH por el primer sustrato (NAD^+). El valor encontrado para la constante K_{ia} fue de $49 \pm 10 \mu\text{M}$, el cual es muy similar al valor encontrado para $K_{m\text{NAD}}$, indicando que al encontrarse bajo las concentraciones de NAD^+ probadas en el ensayo la formación del complejo enzima sustrato se lleva a cabo rápidamente, y que la BADH se encuentra mayoritariamente formando el complejo con NAD^+ que en su estado libre.

Se realizaron ensayos de patrones de velocidad de BADH en presencia de peróxido de hidrógeno 0.1 mM (Figuras 10 y 11). Al analizar la eficiencia de la enzima se encontró que ésta disminuyó ante el estrés oxidativo en un 40%, debido a que la V_{max} encontrada fue de $1.7 \pm 0.09 \mu\text{moles/min/mg}$ de proteína.

Al encontrarse el peróxido de hidrógeno en el medio de ensayo se altera la constante de afinidad de unión de la enzima por los sustratos (K_m). Dicho cambio se observa en la disminución en el valor de K_m aparente para ambos sustratos, con un valor de $28.7 \pm 7 \mu\text{M}$ para el NAD^+ y $85 \pm 8 \mu\text{M}$ para BA. A pesar de que la constante de afinidad muestra un incremento en la afinidad aparente por los sustratos, la eficiencia de BADH (V_{max}) disminuye. Esto apunta al hecho de que los aminoácidos conservados que se encuentran en el sitio activo (Perez-Miller y Hurley, 2003), que no llevan a cabo la unión de los sustratos, se modifican por acción del H_2O_2 , de tal forma que no se impide la unión de los sustratos, pero sí alteran la catálisis, lo que se ve reflejado en la disminución del valor de V_{max} .

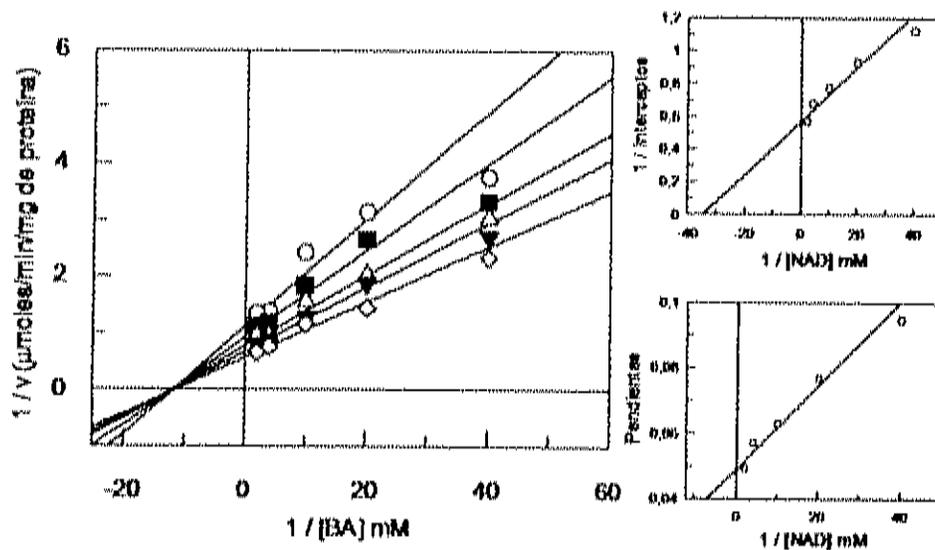


Figura 10. Gráfico de dobles recíprocos de velocidad inicial de BADH para el sustrato NAD^+ a pH 8.0 en presencia de H_2O_2 . Se variaron las concentraciones de BA en concentraciones fijas de NAD^+ (○) 0.025, (■) 0.05, (△) 0.1, (▼) 0.25 (◇) 0.5 mM en presencia de H_2O_2 (0.1 mM). Cada punto experimental representa la media de 3 ensayos.

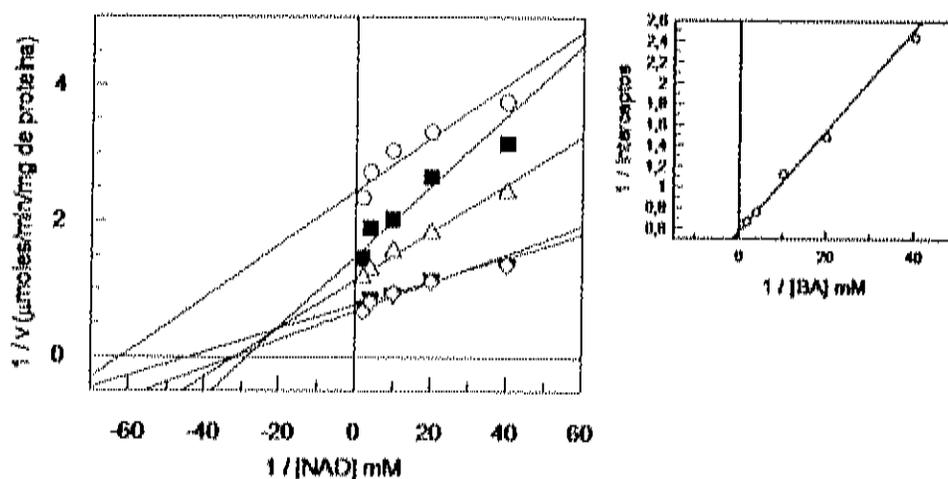


Figura 11. Gráfico de dobles recíprocos de velocidad inicial de BADH para el sustrato BA a pH 8.0 en presencia de H_2O_2 . Se variaron las concentraciones de NAD^+ en concentraciones fijas de BA (○) 0.025, (■) 0.05, (△) 0.1, (▼) 0.25 (◇) 0.5 mM en presencia de H_2O_2 (0.1 mM). Cada punto experimental representa la media de 3 ensayos.

CAPITULO III

Análisis Cinético de la Inhibición de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de Riñón de Cerdo por Peróxido de Hidrógeno

Resumen

Se obtuvieron los patrones de inhibición de BADH por peróxido de hidrógeno en un rango de concentración de 0 a 200 μM . Se encontró inhibición de tipo mixto con respecto al sustrato NAD^+ , tanto a concentraciones saturantes como subsaturantes de BA a pH 7.0 u 8.0. Con respecto al sustrato BA, se determinó una inhibición no competitiva a concentraciones saturantes y subsaturantes de NAD^+ a los dos pH probados. Los datos de la inhibición fueron analizados mediante las ecuaciones mixta y no competitiva para obtener las constantes cinéticas, encontrando un valor de $V_{\text{max}} = 0.7 \pm 0.02$ y 0.4 ± 0.02 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ a pH 7.0 y concentraciones saturantes y subsaturantes de BA, respectivamente. A pH 8.0, se calculó un valor de 1.7 ± 0.03 y 0.6 ± 0.009 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ a concentraciones saturantes y subsaturantes de BA, respectivamente. Se observaron cambios en la K_{mNAD} y K_{mBA} a ambos pH. La constante de inhibición para el peróxido de hidrógeno (K_i) se obtuvo ajustando los datos a las ecuaciones correspondientes. A pH 7.0, se determinó una K_i de 115 ± 28 μM a concentraciones saturantes, y una K_i de 163 ± 44 μM a concentraciones subsaturantes de BA, respectivamente. A concentraciones saturantes y subsaturantes de NAD^+ se encontró una K_i de 400 ± 49 μM y 203 ± 18 μM , respectivamente. Las K_i calculadas a pH 8.0 a BA saturante y subsaturante fueron de 108 ± 20 y 224 ± 54 μM . Bajo NAD^+ saturante y subsaturante, se calculó un valor de $K_i = 206 \pm 15$ y de 290 ± 26 μM , respectivamente.

Introducción

El peróxido de hidrógeno es una de las especies reactivas de oxígeno más estables, que además puede atravesar las membranas, causando daño en los distintos componentes celulares (Touyz, 2004). En general, modifica casi a todos los aminoácidos que conforman las proteínas, pero algunos son más susceptibles a estos cambios. Debido a esto, la proteína dañada puede perder su función biológica poniendo en riesgo el metabolismo del organismo (Coyle, *et al.*, 2006; Luo y Anderson, 2006; Schoneich y Sharov, 2006). En los últimos años, han surgido datos que ponen en tela de juicio la teoría del envejecimiento como consecuencia de los radicales libres, pues se considera al peróxido de hidrógeno más como un regulador del metabolismo que como un peligroso agente capaz de dañar constituyentes celulares importantes (Voeikov, 2006).

Los estudios de inhibición que se han realizado con la enzima BADH renal han utilizado solamente a análogos de los sustratos, como son el AMP y colina (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000), mientras que algunos otros se refieren al efecto inhibitorio que tiene la concentración de urea sobre la enzima (Ayala-Castro y Valenzuela-Soto, 2007). Son escasos los estudios de inhibición realizados en otras BADH pertenecientes a la misma clase (Velasco-García, *et al.*, 1999).

A la fecha, no existe ningún estudio cinético del tipo de inhibición que el peróxido de hidrógeno puede ejercer sobre la BADH. Existen unos cuantos trabajos que analizan solamente la causa-efecto del estrés oxidativo sobre ALDHs en líneas celulares (Coyle, *et al.*, 2006; Ohsawa, *et al.*, 2003; Ohta, *et al.*, 2004). Sin embargo, hay muchas interrogantes acerca de los efectos a nivel molecular provocados por este estrés en los compuestos celulares.

Los resultados de los ensayos de patrones de velocidad inicial demostraron que la eficiencia de la enzima BADH se reduce por efecto de la adición de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, es necesario realizar

estudios de inhibición para identificar y entender de mejor manera como este daño puede ser ocasionado. En particular, en esta sección se planteó como objetivo analizar el cambio en las constantes de inhibición y el tipo de inhibición causado por el estrés oxidativo sobre la BADH renal.

Materiales y métodos

Purificación de la enzima

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo fue purificada según lo descrito por (Guzman-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). La actividad específica final de la enzima utilizada fue 2.5 μ moles/min/mg de proteína a 25 °C, utilizando 0.1 M HEPES-KOH, pH 8.0, 0.5 mM BA, 0.1 mM NAD⁺.

Ensayo de inhibición enzimática

Se utilizaron concentraciones fijas de un sustrato y concentraciones variables del otro sustrato y viceversa para cada ensayo de inhibición. El inhibidor H₂O₂ fue adicionado al medio de ensayo a distintas concentraciones (0-200 μ M). La lectura se realizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm durante 3 minutos. Cada unidad de actividad es equivalente a 1 μ moles/min/mL de NADH formado.

Análisis de datos

Para el análisis de los parámetros de inhibición, se utilizaron las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, descritas en el capítulo anterior, para determinar las constantes cinéticas específicamente bajo las

condiciones del ensayo. Se utilizó, de igual forma, el programa Grafit 4.0 (Erithacus Software Ltd., Staines, UK) para el análisis de los datos.

El tipo de inhibición provocado por el peróxido de hidrógeno fue analizado gráficamente a través de la ecuación de dobles recíprocos. Para obtener las constantes de inhibición, se utilizó la ecuación del tipo mixto (Ec. 5) para el primer sustrato y la ecuación no competitiva (Ec. 6) para el segundo.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) [S]} \quad \text{Ec. 5}$$

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S] \cdot \frac{1}{1 + [I]/K_i}}{K_m + [S]} \quad \text{Ec. 6}$$

En donde V_{max} es la velocidad máxima; S es la concentración de sustrato; K_m es la constante de Michaelis-Menten para el sustrato y K_i es la constante de inhibición para el peróxido de hidrógeno.

Resultados y discusión

Se analizó el efecto inhibitorio del H_2O_2 sobre la BADH, utilizando el pH óptimo de la enzima (pH 8.0), manteniendo una concentración fija saturante de BA (0.5 mM) y variando la concentración de NAD^+ (0.05 – 0.5 mM). El tipo de inhibición encontrado para la enzima por el H_2O_2 respecto al sustrato NAD^+ fue del tipo mixto. En la figura 12A, se puede observar el tipo de inhibición mixto, que se caracteriza por un cruce de las líneas en el primer cuadrante (-x, y), causando una modificación tanto del valor de V_{max} (intercepto en eje y) como del valor de K_m (intercepto eje x) conforme se incrementa la concentración de H_2O_2 .

Se analizaron los datos encontrados para la inhibición de BADH respecto al sustrato NAD^+ mediante la ecuación de tipo mixta (Ec. 5). Se

encontró que la concentración de H_2O_2 necesaria para inhibir a la enzima BADH respecto al sustrato NAD^+ (K_i) bajo concentración saturante de BA, fue cercana a $100 \mu M$. Este valor sobrepasó por más del doble la constante de afinidad para el sustrato NAD^+ (K_{mNAD}), lo que indica la concentración requerida para la unión del sustrato NAD^+ equivalente a $37 \mu M$. Sin embargo, la eficiencia catalítica de la enzima BADH se redujo en un 40 % (Tabla 2).

En cuanto a la inhibición de BADH respecto al sustrato BA, ésta fue del tipo no competitivo. En la figura 12B se muestra el tipo de inhibición mixto, representado por un cruce de las líneas en el eje de las x que modifica solamente el valor de V_{max} (intercepto eje y), manteniéndose constante el valor de K_m (intercepto eje x) conforme se incrementa la concentración de H_2O_2 .

Los resultados de la inhibición de BADH respecto al sustrato BA fueron analizados mediante la ecuación de tipo no competitivo (Ec. 6). La constante de inhibición encontrada para la inhibición no competitiva fue dos veces mayor respecto a la inhibición mixta determinada con respecto al sustrato NAD^+ ($200 \mu M$), indicando que se requiere una concentración mucho mayor de H_2O_2 para provocar la inhibición de la enzima respecto al sustrato BA. De tal forma, que la reducción en la V_{max} respecto al sustrato BA solamente fue de un 27 % (Tabla 2).

Utilizando una concentración subsaturante de los sustratos en el medio de ensayo, el peróxido de hidrógeno causó el mismo tipo de inhibición respecto a los dos sustratos, mixta para el sustrato NAD^+ (Fig.13A) y no competitiva para BA (Fig. 13B). Además, se demostró que se requiere una concentración mayor de H_2O_2 para causar la inhibición ($0.26 \pm 0.3 \text{ mM}$). La reducción de la eficiencia máxima de la enzima fue mucho más severa, ocasionando una disminución de un 80% cuando se determinó en función del NAD^+ , y de un 60% con respecto a BA.

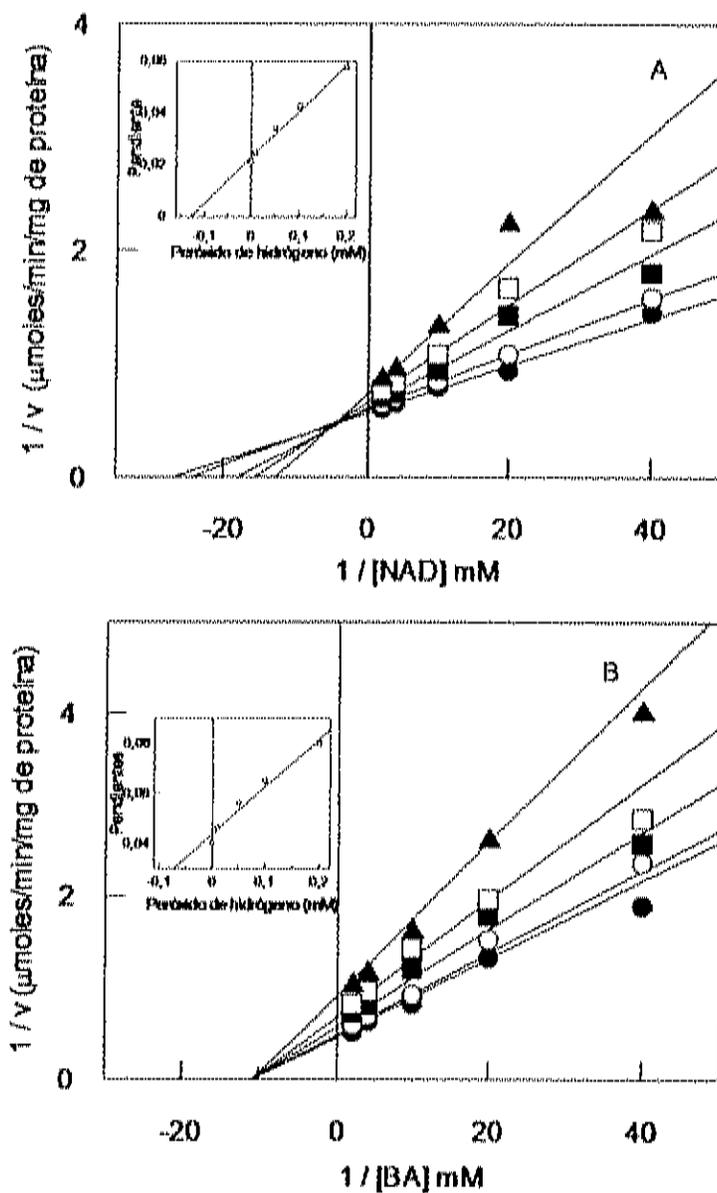


Figura 12. Inhibición de la enzima BADH por peróxido de hidrógeno a concentraciones saturantes de sustrato a pH 8.0. (A) Se analizaron los datos linearizando según Lineweaver-Burk a concentración variable de NAD^+ (0.025 – 0.5 mM) y concentración fija de BA (0.5 mM). (B) Se manejó una concentración variable de BA (0.025 – 0.5 mM) y concentración fija de NAD^+ (0.5 mM). Se utilizó peróxido de hidrógeno como inhibidor (●) 0, (○) 0.01, (■) 0.05, (□) 0.1, (▲) 0.2 mM. Recuadro inserto: regráfico de pendientes vs. concentración de peróxido de hidrógeno de cada una de las líneas.

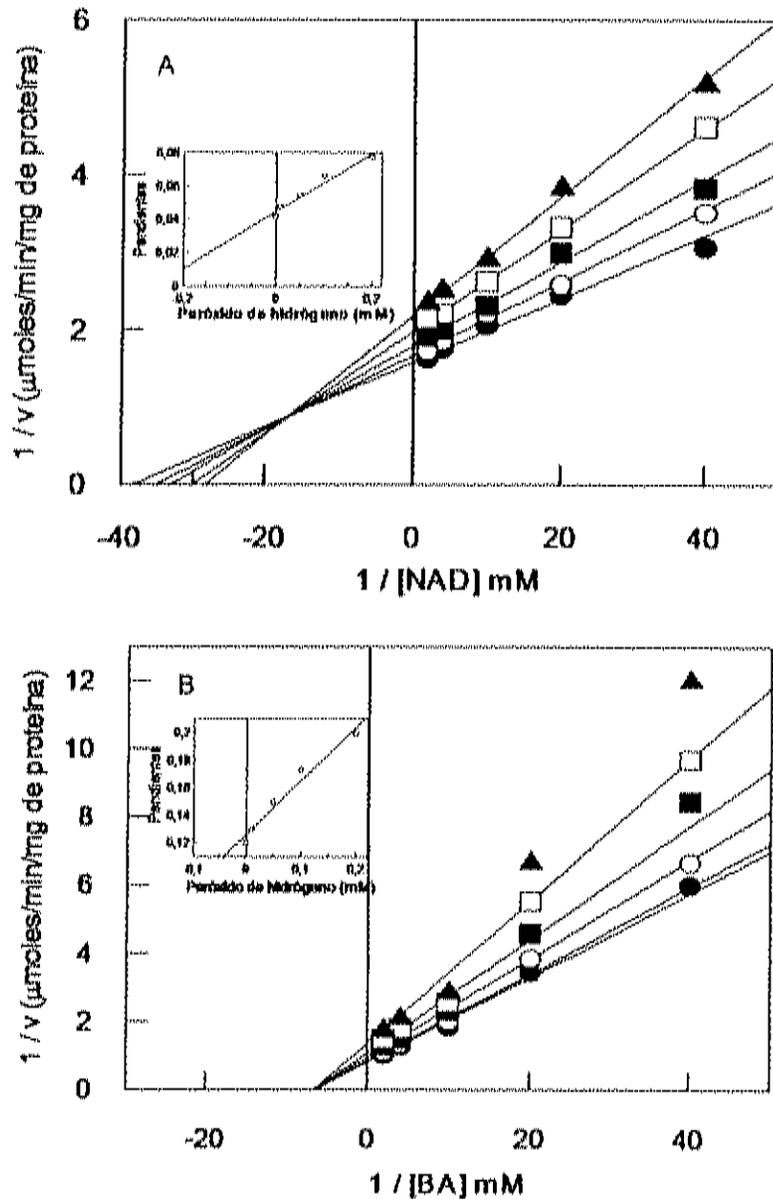


Figura 13. Inhibición de la enzima BADH por peróxido de hidrógeno a concentraciones subsaturantes de sustrato a pH 8.0. (A) Se analizaron los datos linearizando según Lineweaver-Burk a concentración variable de NAD⁺ (0.025 – 0.5 mM) y concentración fija de BA (0.05 mM). (B) Se manejó una concentración variable de BA (0.025 – 0.5 mM) y concentración fija de NAD⁺ (0.05 mM). Se utilizó peróxido de hidrógeno como inhibidor (●) 0, (○) 0.01, (■) 0.05, (□) 0.1, (▲) 0.2 mM. Recuadro inserto, regráfico de pendientes vs. concentración de peróxido de hidrógeno de cada una de las líneas.

Se realizaron los ensayos a concentraciones subsaturantes y saturantes de sustratos utilizando el pH fisiológico en el medio de ensayo (pH 7.0). Los resultados a este pH (Tabla 2), indicaron que los tipos de inhibición, así como las concentraciones de H₂O₂ suficientes para inhibir a la enzima, fueron similares a las encontradas para el pH óptimo (pH 8.0). Sin embargo, la eficiencia de la enzima se redujo más de un 85% para ambos sustratos.

Los cambios en las constantes cinéticas y el tipo de inhibición presentado para cada uno de los sustratos, indicaron que el mecanismo de la enzima BADH es afectado por el peróxido de hidrógeno. En la figura 14, se propone que el peróxido de hidrógeno puede estar alterando, tanto a la BADH libre como a la formación del complejo BADH-NAD⁺, provocando una inhibición de tipo mixto. A su vez, el peróxido pudo afectar la formación del complejo BADH-NAD⁺-BA, dando lugar a una inhibición de tipo no competitivo.

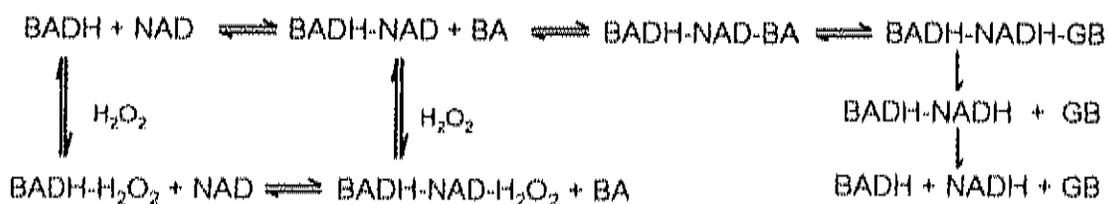


Fig. 14. Mecanismo cinético de BADH afectado por peróxido de hidrógeno.

Se ha determinado que para las aldehído deshidrogenasas es importante el orden en la unión de los sustratos, pues una vez unidos, el sustrato aldehído sufre un ataque nucleofílico por la cisteína del sitio activo formando un intermediario covalente. En seguida, el hidrógeno del carbonilo es transferido al anillo de nicotinamida del NAD⁺. A partir de este paso del mecanismo, otros aminoácidos como glutamato, arginina y serina participan en la liberación de los productos NADH y GB (Perez-Miller y Hurley, 2003;

Rodriguez-Zavala y Weiner, 2002). Esto apunta a la importancia de la unión de los sustratos al sitio activo de la enzima y mas aún, la susceptibilidad de los aminoácidos implicados en el mecanismo frente al peróxido de hidrógeno.

Se ha propuesto un mecanismo mediante el cual el peróxido de hidrógeno es capaz de modificar el grupo tiol de la cisteína en soluciones acuosas. También podría formarse puentes disulfuro entre cisteínas que se encuentren cercanas entre sí (Luo y Anderson, 2006).

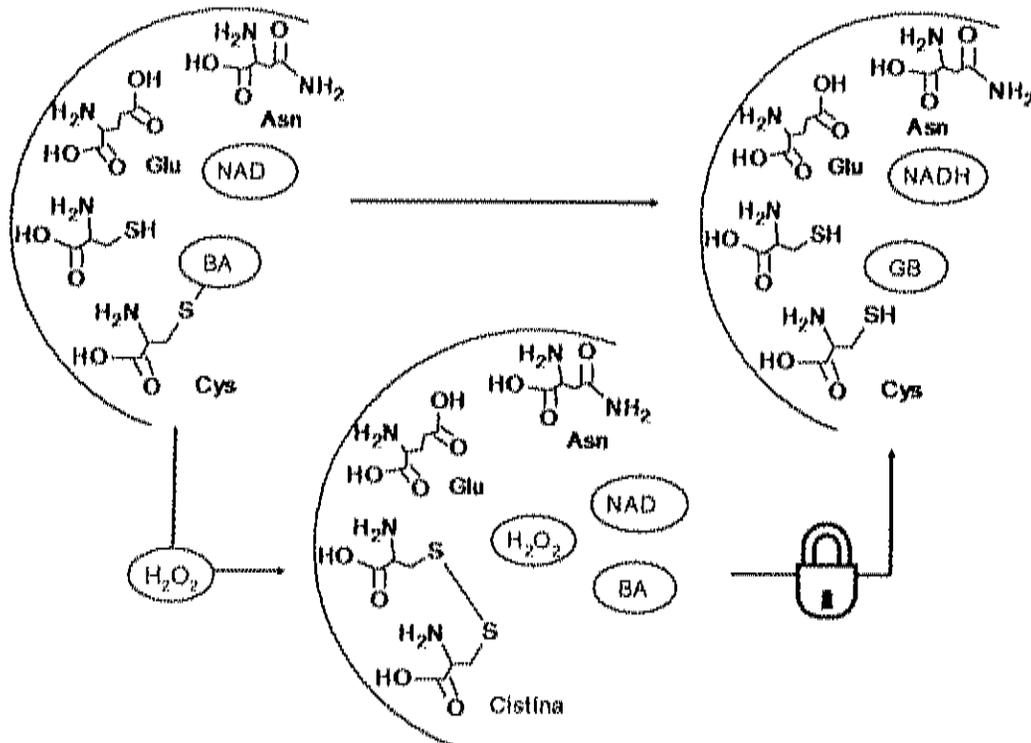


Figura 15. Representación de los aminoácidos presentes en el sitio activo de BADH afectados por el peróxido de hidrógeno.

Aunque la enzima BADH de riñón de cerdo no ha sido secuenciada por completo, las secuencias internas que se tienen, presentan una homología estructural y funcional con otras BADHs que ya han sido secuenciadas (Garza-Ramos, *et al.*, 2007; Gonzalez-Segura, *et al.*, 2005;

Muñoz-Clares y Mujica-Jimenez, 2001; Rodriguez-Zavala y Weiner, 2002). En éstas se indica que existe al menos una cisteína catalítica que es la encargada de la unión del sustrato aldehído. Basándonos en el mecanismo por el cual el peróxido puede causar daño a las proteínas propuesto por Lou y Anderson, el peróxido puede estar induciendo la formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas que se encuentren en el sitio activo de BADH, lo cual impediría la unión de los sustratos en el sitio activo, y por ende, afectaría la eficiencia de la enzima (Fig. 15). Otra posibilidad sería que el peróxido modifique otras cisteínas diferentes, las cuales pudieran modificar la estructura cuaternaria de la proteína, lo cual se reflejaría en cambios en la actividad de la BADH.

Tabla 2. Efecto de peróxido de hidrógeno en los parámetros cinéticos de la BADH a concentraciones subsaturantes y saturantes de sustratos.

Parámetro	BA subsaturante ¹	BA saturante ²
	pH 8.0	
<i>V</i> _{max} (μmoles/min/mg)	0.6197 ± 0.0094	1.7292 ± 0.0334
<i>K</i> _{m(NAD)} (mM)	0.0269 ± 0.0018	0.0378 ± 0.0030
<i>K</i> _i (mM)	0.2243 ± 0.0540	0.1082 ± 0.0202
	pH 7.0	
<i>V</i> _{max} (μmoles/min/mg)	0.3956 ± 0.0175	0.6552 ± 0.0170
<i>K</i> _{m(NAD)} (mM)	0.1934 ± 0.0201	0.0528 ± 0.0048
<i>K</i> _i (mM)	0.1627 ± 0.0437	0.1153 ± 0.0275
	NAD ⁺ subsaturante ¹	NAD ⁺ saturante ²
	pH 8.0	
<i>V</i> _{max} (μmoles/min/mg)	1.2379 ± 0.0382	2.1473 ± 0.0522
<i>K</i> _{m(BA)} (mM)	0.1534 ± 0.0110	0.0918 ± 0.0060
<i>K</i> _i (mM)	0.2902 ± 0.0264	0.2063 ± 0.0153
	pH 7.0	
<i>V</i> _{max} (μmoles/min/mg)	0.5264 ± 0.0235	0.7651 ± 0.0602
<i>K</i> _{m(BA)} (mM)	0.1974 ± 0.0197	0.4859 ± 0.0632
<i>K</i> _i (mM)	0.2029 ± 0.0175	0.3999 ± 0.0494

¹Subsaturante = 0.05 mM, ²Saturante = 0.5 mM

Es importante resaltar que en todos los ensayos de inhibición realizados y a pesar del efecto del peróxido sobre la eficiencia de la enzima, siempre se mostró una preferencia por unir al sustrato NAD^+ previo a la unión del sustrato BA, lo que indica que el orden de unión de los sustratos a la enzima BADH no se modifica.

CONCLUSIONES

- El peróxido de hidrógeno disminuyó la actividad de la BADH a una concentración de 0.1 mM, debido a que se perdió más del 50% de la actividad enzimática tanto a 25°C, como a 37°C.
- La fuerza iónica fisiológica no protegió a la enzima contra las condiciones de estrés oxidativo, ya que se redujo la actividad en un 43% al encontrarse KCl 0.15 M en el medio de ensayo.
- El efecto del peróxido sobre la actividad de BADH es modulado por pH. A pH 6.4 la actividad de la enzima se redujo en un 50%, con respecto a la obtenida al pH óptimo (pH 8).
- Los cambios en la eficiencia de la enzima BADH provocados por el H₂O₂ se vieron reflejados en los valores de las constantes cinéticas de la enzima. El valor de la velocidad máxima disminuyó al encontrarse la BADH en condiciones de estrés oxidativo.
- La afinidad de unión de la enzima por el sustrato se modificó ante la adición de peróxido de hidrógeno.
- El tipo de inhibición causado por H₂O₂ para los sustratos de la enzima BADH fue del tipo mixto para el NAD⁺, al alterar los valores de V_{max} y K_m . El tipo de inhibición presentado para BA fue no competitivo, ya que solamente se modificó su V_{max} respecto al H₂O₂.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahsan, H., Ali, A. y Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* 131. 398-404.
- Ayala-Castro, H.G. y Valenzuela-Soto, E.M. (2007). Ionic strength dependency of urea effect on renal betaine aldehyde dehydrogenase stability. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13. E. Maser, B. Plapp, R. Lindahl and H. Welner (eds). Purdue University Press. 77-82.
- Bayraktutan, U. (2002). Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes Metab.* 4. 224-238.
- Beckman, K.B. y Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78. 547-581.
- Burg, M.B., Kwon, E.D. y Peters, E.M. (1996). Glycerophosphocholine and betaine counteract the effect of urea on pyruvate kinase. *Kidney Int Suppl.* 57. 100-104.
- Chern, M.K. y Pietruszko, R. (1999). Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochem. Cell Biol.* 77. 179-187.
- Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis.* 2nd ed. New York. Wiley-vch.
- Coresh, J., Astor, B.C., Greene, T., Eknoyan, G. y Levey, A.S. (2003). Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis.* 41. 1-12.

- Coyle, H.C., Martinez, J.L., Coleman, C.M., Spitz, R.D., Weintraub, L.N. y Kader, N.K. (2006). Mechanisms of H₂O₂ - Induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 40. 2206 - 2213.
- Daiber, A., Oelze, M., Coldewey, M., Bachschmid, M., Wenzel, P., Sydow, K., Wendt, M., Kleschyov, A.L., Stalleicken, D., Ullrich, V., Mulsch, A. y Munzel, T. (2004). Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol.* 66. 1372-1382.
- Evans, P. y Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci.* 884, 19-40.
- Falkenberg, P. y Strom, A.R. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1034. 253-259.
- Fariss, M.W., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B. y Orrenius, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv.* 5. 94-111.
- Figuroa-Soto, C.G., Lopez-Cervantes, G. y Valenzuela-Soto, E.M. (1999). Immunolocalization of betaine aldehyde dehydrogenase in porcine kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 258. 732-736.
- Figuroa-Soto, C.G. y Valenzuela-Soto, E.M. (2000). Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 269. 596-603.
- Garcia-Perez, A. y Burg, M.B. (1991). Renal medullary organic osmolytes, *Am Physiological Soc.*
- Garza-Ramos, G., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Mújica-Jiménez, C., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R.A. (2007). Effects of

- monovalent cations on the structure and thermal stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13. E. Maser, B. Plapp, R. Lindahl and H. Weiner (eds). Purdue University Press, 83-90.
- Gieseg, S., Duggan, S. y Gebicki, J.M. (2000). Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochem. J.* 350. 215-218.
- Gonzalez-Segura, L., Velasco-García, R., Rudino-Pinera, E., Mujica-Jimenez, C. y Muñoz-Clares, R.A. (2005). Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 87. 1056-1064.
- Gutiérrez, C.J.R.V. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil.* 31.
- Guyton, A.C. (1992). *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª ed. México, Interamericana, 339.
- Guzman-Partida, A.M. y Valenzuela-Soto, E.M. (1998). Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 119. 485-491.
- Jin, L., Beswick, R.A., Yamamoto, T., Palmer, T., Taylor, T.A., Pollock, J.S., Pollock, D.M., Brands, M.W. y Webb, R.C. (2006). Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 57. 343-357.

- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. y Eklund, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* 7. 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L.P., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, A.R. (2007). Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13. E. Maser, B. Plapp, R. Lindahl and H. Weiner (eds). Purdue University Press, 64-76.
- Ki Ho, K. y Weiner, H. (2007). Can we change the rate-limiting step of an aldehyde dehydrogenase? *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13. E. Maser, B. Plapp, R. Lindahl and H. Weiner (eds). Purdue University Press. 3-8.
- Kohen, R. y Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30. 620-650.
- Kultz, D. (2004). Hyperosmolality triggers oxidative damage in kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101. 9177-9178.
- Kwon, E.D., Dooley, J.A., Jung, K.Y., Andrews, P.M., Garcia-Perez, A. y Burg, M.B. (1996). Organic osmolyte distribution and levels in the mammalian urinary bladder in diuresis and antidiuresis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 271. 230-233.
- Locatelli, F., Canaud, B., Eckardt, K.U., Stenvinkel, P., Wanner, C. y Zoccali, C. (2003). Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 18. 1272-1280.

- Luo, D. y Anderson, B.D. (2006). Kinetics and mechanism for the reaction of cysteine with hydrogen peroxide in amorphous polyvinylpyrrolidone lyophiles. *Pharm Res.* 23. 2239-2253.
- Martin, C.J. y Goeddeke-Merickel, C.M. (2005). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Nephrol Nurs J.* 32. 683-685.
- Martínez-Cayueta, M. (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica.* 39. 5-18.
- Messner, B. y Boll, M. (1994). Cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 39. 69-78.
- Moeckel, G.W. y Lien, Y.H. (1997). Distribution of de novo synthesized betaine in rat kidney: role of renal synthesis on medullary betaine accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 272. 94-99.
- Mori, N., Yoshida, N. y Kitamoto, Y. (1992). Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferm. Bioeng.* 73. 352-356.
- Muñoz-Clares, R.A. y Mujica-Jimenez, C. (2001). Complexes of NADH with betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of the plant *Amaranthus hypochondriacus* L. *Chem Biol Interact.* 130-132. 71-80.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. y Ogata, K. (1976). Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* 40. 1743-1749.
- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yasuda, C., Kamino, K. y Ohta, S. (2003). Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases

- vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J Neurochem.* 84. 1110-1117.
- Ohta, S., Ohsawa, I., Kamino, K., Ando, F. y Shimokata, H. (2004). Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 1011. 36-44.
- Olivares-Quiroz, L. y Scherer, L.G.C. (2004). Plegamiento de las proteínas: un problema interdisciplinario. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48.
- Parker, J.D. (2004). Nitrate tolerance, oxidative stress, and mitochondrial function: another worrisome chapter on the effects of organic nitrates. *J Clin Invest.* 113. 352-354.
- Perez-Miller, S.J. y Hurley, T.D. (2003). Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry.* 42. 7100-7109.
- Pérez-Pérez, L.M. (2000). Estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Rev. Cubana Endocrinol.* 11. 139-142.
- Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.* 3. 1129-1134.
- Rodríguez-Zavala, J.S. y Weiner, H. (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry.* 41. 8229-8237.
- Schoneich, C. y Sharov, V.S. (2006). Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 41. 1507-1520.
- Segel, H.I. (1976). *Biochemical Calculations.* 2nd ed. New York. John Wiley & Sons Inc. 208-225.

- Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 32, 307-326.
- Touyz, R.M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 44, 248-252.
- Valenzuela-Soto, E.M., Ayala-Castro, G.H. y Muñoz-Clares, A.R. (2005). Effects of monovalent and divalent cations on the thermostability of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 12. E. Maser, B. Plapp, R. Lindahl and H. Weiner (eds). Purdue University Press. 104-109.
- Valenzuela-Soto, E.M. y Muñoz-Clares, R.A. (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J Plant Physiol.* 143, 145-152.
- Valenzuela-Soto, E.M., Velasco-Garcia, R., Mujica-Jimenez, C., Gaviria-Gonzalez, L.L. y Muñoz-Clares, R.A. (2003). Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem Biol Interact.* 143-144, 139-148.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K.F. y Nebert, D.W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics.* 9, 421-434.

- Velasco-Garcia, R., Mujica-Jimenez, C., Mendoza-Hernandez, G. y Muñoz-Clares, R.A. (1999). Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 181. 1292-1300.
- Vicedo, T.A. y Vicedo, O.Y. (2000). Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 19. 206-212.
- Voeikov, V.L. (2006). Reactive oxygen species--(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J Altern Complement Med.* 12. 111-118.
- Warner, D.S., Sheng, H. y Batinic-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 207. 3221-3231.
- Weretilnyk, E.A. y Hanson, A.D. (1989). Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch Biochem Biophys.* 271. 56-63.
- Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, R. y Somero, G. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 217. 1214.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, The Company of Biologists Limited.
- Zhang, Z., Dmitrieva, N.I., Park, J.H., Levine, R.L. y Burg, M.B. (2004). High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101. 9491-9496.

- Velasco-García, R., Mujica-Jimenez, C., Mendoza-Hernandez, G. y Muñoz-Clares, R.A. (1999). Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 181. 1292-1300.
- Vicedo, T.A. y Vicedo, O.Y. (2000). Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 19. 206-212.
- Voelkov, V.L. (2006). Reactive oxygen species--(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J Altern Complement Med.* 12. 111-118.
- Warner, D.S., Sheng, H. y Batinic-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 207. 3221-3231.
- Weretilnyk, E.A. y Hanson, A.D. (1989). Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch Biochem Biophys.* 271. 56-63.
- Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, R. y Somero, G. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 217. 1214.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, The Company of Biologists Limited.
- Zhang, Z., Dmitrieva, N.I., Park, J.H., Levine, R.L. y Burg, M.B. (2004). High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101. 9491-9496.