

# Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A. C.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE BETAINA ALDEHIDO  
DESHIDROGENASA DE RIÑON DE PUERCO

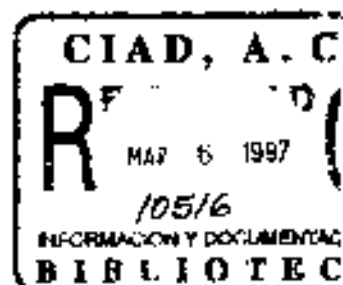
POR

**ANA MARIA GUZMAN PARTIDA**

---

TESIS APROBADA POR LA  
DIRECCION DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
DE LOS ALIMENTOS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD  
EN NUTRICION Y ALIMENTOS



## TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xii
INTRODUCCION .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Mecanismos de Ajuste Osmótico Celular .....	3
Clasificación y Distribución de los Osmolitos Orgánicos. ....	6
Betaina en microorganismos y plantas .....	8
Betaina en mamíferos .....	8
Síntesis Enzimática de Betaina .....	11
Betaina Aldehído Deshidrogenasa (BADH) .....	13
MATERIALES Y METODOS .....	15
Obtención de la Materia Prima .....	15
Extracción y Purificación de la Enzima .....	15
Ensayo de Actividad Enzimática .....	16

<b>Determinación de Proteína</b> . . . . .	17
<b>Electroforesis en Gel de Poliacrilamida</b> . . . . .	17
<b>Estimación de Masa Molecular Aparente</b> . . . . .	17
<b>Estabilidad al pH y pH Optimo</b> . . . . .	18
<b>Especificidad por Sustratos</b> . . . . .	18
<b>Efecto de Cationes y Solutos Compatibles</b> . . . . .	19
<b>Análisis Cinético</b> . . . . .	19
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> . . . . .	21
<b>Purificación de la Enzima</b> . . . . .	21
<b>Estimación de la Masa Molecular</b> . . . . .	25
<b>pH Optimo y Estabilidad al pH</b> . . . . .	25
<b>Especificidad por Sustratos</b> . . . . .	27
<b>Efecto de Cationes y Solutos Orgánicos Compatibles</b> . . . . .	30
<b>Propiedades Cinéticas</b> . . . . .	40
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	50
<b>BIBLIOGRAFIA</b> . . . . .	52

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Purificación de la BADH de Riñón de Puerco. . . . .	22
2	Constantes Cinéticas de la BADH de Riñón de Puerco . . . . .	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sección sagital del riñón (A) y esquema del mecanismo de concentración de orina (B). . . . .	10
2	Camino biosintético de la conversión de colina a betaina aldehído . . . . .	12
3	Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas de la BADH de riñón de puerco . . . . .	23
4	Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras de la BADH de riñón de puerco . . . . .	24
5	Efecto del pH y tipo de buffer en la actividad de la BADH de riñón de puerco . . . . .	26
6	Especificidad por sustratos de la BADH de riñón de puerco . . . . .	28
7	Efecto de cationes monovalentes a concentraciones saturantes de BA y $\text{NAD}^+$ sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco. . . . .	31
8	Efecto de cationes monovalentes a concentraciones subsaturantes de BA y $\text{NAD}^+$ sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco. . . . .	32

9	Efecto de $MgCl_2$ (catión divalente) a concentraciones saturantes y subsaturantes de BA y $NAD^+$ sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco . . . . .	34
10	Efecto de los solutos orgánicos compatibles a concentraciones saturantes de BA y $NAD^+$ sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco . . . . .	37
11	Efecto de los solutos orgánicos compatibles a concentraciones subsaturantes de BA y $NAD^+$ sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco . . . . .	39
12	Representación de la velocidad de reacción, $v$ , en función de la concentración de sustrato, $[NAD^+]$ , para la enzima BADH . . . . .	41
13	Patrones de velocidad inicial para la reacción de la BADH de riñón de puerco a concentraciones variables de $NAD^+$ y fijas de BA . . . . .	42
14	Patrones de velocidad inicial para la reacción de la BADH de riñón de puerco a concentraciones variables de BA y fijas de $NAD^+$ . . . . .	43
15	Mecanismo al azar en equilibrio rápido propuesto para la BADH de riñón de puerco . . . . .	44
16	Regráficos de las pendientes (A) e interceptos (B) de las gráficas de dobles recíprocos de $v$ vs $[BA]$ . . . . .	45
17	Regráficos de las pendientes (A) e interceptos (B) de las gráficas de dobles recíprocos de $v$ vs $[NAD^+]$ . . . . .	47

## RESUMEN

En este estudio se purificó y caracterizó a la Betaina Aldehído Deshidrogenasa (BADH) a partir de riñón de puerco. La purificación se llevó a cabo a través de tres etapas cromatográficas: filtración en gel en Sephadex G-75, intercambio iónico en Q-Sepharose y cromatografía de afinidad en Sepharose 5'-AMP. La pureza de la BADH se corroboró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas y condiciones desnaturalizantes y reductoras. La masa molecular aparente se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE nativo). Se midió el pH óptimo y la estabilidad de la enzima al pH, así como su posible regulación por cationes monovalentes, cationes divalentes y osmolitos orgánicos. Asimismo, se determinó su especificidad por sustratos y la reversibilidad de la reacción enzimática. Finalmente, se determinó el mecanismo y las constantes cinéticas de la enzima.

La BADH de riñón de puerco se purificó a homogeneidad electroforética aparente, alcanzando una actividad total de 3.02 U y una actividad específica de 6.9 U/mg proteína, representando el 11% de recuperación y 329 veces de purificación. Mediante HPLC, se encontró que la enzima tiene una masa molecular aparente de 677 kDa, y mediante PAGE nativo 688 kDa, y subunidades de 52 kDa, con un pH óptimo de 9.5, aunque es estable en un rango amplio de pH. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas de la enzima, fue específica para  $\text{NAD}^+$  y altamente específica para betaina aldehído (BA). La BADH fue estable a concentraciones altas de sales, principalmente a las sales monovalentes, y

osmolitos orgánicos, excepto a Betaina. La reacción enzimática no fue reversible y de acuerdo a los datos cinéticos, la enzima mostró un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido, teniendo una mayor afinidad por  $\text{NAD}^+$  que por BA.



## INTRODUCCION

Cuando las células de una amplia variedad de organismos, desde eubacterias hasta mamíferos, son expuestas a un medio hiperosmótico (por estrés de agua y/o salino) mantienen su balance osmótico y su volumen celular mediante la acumulación de ciertos solutos orgánicos conocidos como osmolitos. Estos solutos generalmente no perturban las estructuras macromoleculares de las células, en contraste a los efectos de las sales comunes (Yancey y Burg, 1990, Handler y Kwon, 1993).

Uno de los osmolitos orgánicos más ampliamente estudiado es la betaina. En mamíferos, este compuesto se encuentra presente en el hígado, en el cual funciona principalmente como donador de grupos metilo; y en el riñón, donde actúa como un osmoprotector, contra las altas concentraciones de NaCl que se tienen en el fluido extracelular como parte del mecanismo de concentración urinario, donde la médula renal juega un papel decisivo en la producción de orina hiper o hipotónica (Beck *et al.*, 1988a; Bagnasco *et al.*, 1986; García Pérez y Burg, 1991a).

El estudio de las enzimas involucradas en la acumulación de betaina ha sido centro de atención de mucha investigación en plantas y microorganismos, pero poco es lo que se conoce de ellas en animales. Actualmente, se sabe que en plantas la betaina es sintetizada en el cloroplasto mediante dos pasos de oxidación de colina (Weigel *et al.*, 1986), donde el segundo paso es catalizado por la enzima betaina aldehído deshidrogenasa. Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad y caracterizada en algunas plantas y microorganismos (Weretilnyk y Hanson,

1989; Falkenberg y Strom, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994); sin embargo, hasta antes de efectuar este trabajo, no había sido purificada ni caracterizada a partir de células animales.

Por todo lo anterior, el objetivo del presente estudio fue purificar y caracterizar a la enzima betaina aldehído deshidrogenasa de riñón con el fin de conocer algunas de sus propiedades e identificar su mecanismo de reacción y así poder explicar en parte los mecanismos bioquímicos utilizados por las células animales para defenderse del estrés hídrico y/o salino.

## ANTECEDENTES

Las células de cualquier organismo viviente pueden estar sujetas a factores físicoquímicos o ambientales capaces de producir un daño reversible o irreversible (pero reparable) en su funcionamiento normal. A estos factores se le han denominado con el término de "estrés". El estrés por factores ambientales incluye al estrés por efecto de temperatura, radiación, nutrientes, anaerobiosis, y el inducido por déficit de agua y/o salinidad (osmótico) (Rhodes, 1987).

Un aumento en la concentración de solutos extracelulares produce en la célula un estado de estrés osmótico, haciendo que el agua intracelular se mueva hacia el medio extracelular y se produzcan cambios en la concentración de solutos intracelulares y por tanto, en el volumen celular, lo que a su vez puede provocar cambios en las macromoléculas, tanto a nivel estructural como fisiológico. Todo esto hace que las células tengan que llevar a cabo procesos de adaptación o mecanismos de ajuste osmótico para restaurar sus condiciones normales a valores que no distorsionen su función (Csonka y Hanson, 1991).

### Mecanismos de Ajuste Osmótico Celular

Un aspecto importante en la adaptación de cualquier organismo al déficit de agua y al estrés por salinidad, es la acumulación de solutos. El ajuste osmótico por acumulación de solutos es la principal respuesta adaptativa al estrés osmótico y puede ser considerado ya sea como un mecanismo de tolerancia o como de anulación. Así, los organismos, para poder adaptarse a los bajos potenciales de

agua, reteniendo el volumen y la turgencia, deberán alcanzar un potencial de soluto bajo:

$$\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p + \Psi_m$$

donde  $\Psi$  es el potencial de agua total,  $\Psi_{\pi}$  el potencial osmótico del soluto,  $\Psi_p$  la turgencia o potencial de presión y  $\Psi_m$  el potencial de matriz (Rhodes, 1987).

Muchos organismos han desarrollado mecanismos complejos para el balance de su fuerza osmótica con su medio circundante. Es decir, son capaces de evitar la deshidratación tomando o sintetizando moléculas que actúan como agentes de balance osmótico. Teóricamente, un gran número de compuestos pudieran servir para esta función. Sin embargo, un organismo puede utilizar solamente unos pocos compuestos que cumplen con esta necesidad (Le Rudulier *et al.*, 1984).

Cuando las células se encogen en respuesta a un medio ambiente hipertónico, regulan el regreso hacia su volumen normal, tomando sales de sodio o de potasio, seguido de agua. Sin embargo, esta respuesta es temporal, por lo que a largo plazo las células generalmente no balancean la alta concentración de sales extracelulares con una concentración interna igualmente alta de sales de sodio y potasio, excepto las plantas y microorganismos halofílicos (Yancey *et al.*, 1982; Beck *et al.*, 1984; García-Pérez y Burg, 1991a; Handler y Kwon, 1993)

Aunque muchas funciones bioquímicas requieren de iones inorgánicos específicos, el aumento en la concentración por arriba de lo encontrado normalmente dentro de la célula (0.05-0.1 M de NaCl y 0.1-0.15 M de KCl), frecuentemente conduce a un daño en su función (Yancey *et al.*, 1982; Csonka y Hanson, 1991), debido al efecto perturbador que tienen sobre macromoléculas

tales como proteínas y ácidos nucleicos. Los niveles altos de solutos perturbadores afectan la estabilidad conformacional de las proteínas, y en el caso particular de las enzimas, impiden la función, ya sea porque se unen al sitio activo y/o debido a un acceso bloqueado para los sustratos. También pueden cambiar la  $K_m$  y  $V_{max}$  de las enzimas y el pK de los grupos de disociación involucrados en la unión del ligando, además de formar complejos en solución con los sustratos libres y cofactores (Von-Hippel y Schleich, 1969; Somero, 1986; Garcia-Perez y Burg, 1991b).

Muchas células han mostrado adaptarse al aumento en la fuerza osmótica interna sintetizando y acumulando los llamados "solutos orgánicos compatibles", también conocidos como "osmolitos orgánicos". Estos compuestos reestablecen la osmolalidad intracelular o estabilizan a las macromoléculas biológicas en un medio con baja actividad de agua. Dichos efectos no son mutuamente excluyentes, aunque no está claro cuál es más importante para un osmoprotectante dado (Csonka y Hanson, 1991).

Los osmolitos orgánicos no perturban la función biológica celular debido a que usualmente carecen de una carga eléctrica neta que les permita formar complejos con los diversos metabolitos (Yancey *et al.*, 1982; Higgins *et al.*, 1987; Garcia-Pérez y Burg, 1991a,b). Aunque la naturaleza exacta de la relación soluto-macromolécula es incierta, parece que estos compuestos se excluyen de la superficie de las proteínas y de su esfera de hidratación inmediata, tendiendo a estabilizar los dobleces de la estructura terciaria de las proteínas (Wyn Jones *et al.*, 1977; Paleg *et al.*, 1981; Hochacka y Somero, 1984; Yancey, 1994). También se ha propuesto que los osmolitos orgánicos pueden interactuar con las membranas

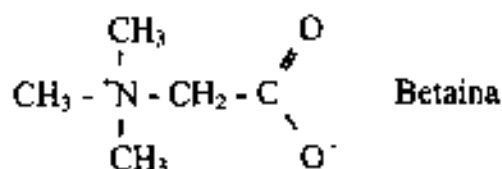
celulares o estabilizarlas (o a las proteínas ligadas a ellas) (Schwab y Heber, 1984; Steponkus, 1984).

### **Clasificación y Distribución de los Osmolitos Orgánicos.**

Los osmolitos orgánicos se han agrupado en varias clases: a) alcoholes polihídricos o polioles, como glicerol, manitol, sacarosa, sorbitol e inositol; b) aminoácidos libres y sus derivados, como prolina, glicina, alanina y taurina; y c) metilaminas, como glicina-betaína, sarcosina, N-óxido de trimetilamina y glicerolfosforilcolina. A este último grupo también se le conoce como de "osmolitos contraatacantes", ya que estabilizan la estructura de las proteínas cuando son perturbadas por la presencia de urea en una relación 1:2 (metilamina:urea) (Yancey *et al.*, 1982). Otro grupo de osmolitos actualmente considerado son los compuestos sulfonio terciarios, dentro de los cuales se incluyen a colina-O-sulfato y  $\beta$ -dimetilsulfoniopropionato (Rhodes y Hanson, 1993).

Los osmolitos orgánicos se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se les ha encontrado en microorganismos tales como bacterias (Brown y Simpson, 1972; Strom *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1987; Csonka y Hanson, 1991, Hanson *et al.*, 1991) y hongos (Brown, 1976; Mori *et al.*, 1980). También se han reportado en plantas (Wyn Jones y Storey, 1981; Hanson y Hitz, 1982; McCue y Hanson, 1990; Rhodes y Hanson, 1993, Yancey, 1994) y en animales como peces cartilaginosos (Yancey, 1985), Aves (Braun, 1985; Lien *et al.*, 1993) y mamíferos (Bagnasco *et al.*, 1986; Beck *et al.*, 1988a,b, 1993; Garcia-Pérez y Burg, 1991a,b; Handler y Kwon, 1993; Nakanishi *et al.*, 1993). Sin embargo, el osmolito más

estudiado en los últimos años es la glicina-betaina (Betaina; N,N,N-trimetil glicina).



La Betaina es un compuesto cuaternario de amonio que se acumula en una amplia variedad de plantas superiores, bacterias, cianobacterias, algas y animales en respuesta al estrés de agua y/o salino. Se ha propuesto que este compuesto actúa como un osmolito no tóxico, localizado preferencialmente en el citoplasma de las células (Schróppel-Meier y Kaiser, 1988). Se han descrito una gran cantidad de posibles funciones para este compuesto, entre las cuales se tienen las siguientes: (1) protección parcial de enzimas aisladas de plantas superiores y cianobacterias contra la inhibición causada por NaCl y KCl (Wyn Jones y Storey, 1981; Mancas *et al.*, 1986; Rhodes y Hanson, 1993), (2) compartimentalización de iones (Ahmad *et al.*, 1987), (3) estabilización de membranas (Jolivet *et al.*, 1983; Rudolph, 1986), (4) replicación del DNA a nivel bacteriano (Meury, 1988), (5) protección de las membranas de los tilacoides contra el estrés por congelamiento (Coughlan y Heber, 1982), (6) protección de cloroplastos aislados de plantas salinizadas, evitando la pérdida de actividad fotosintética durante el almacenamiento (Rhodes y Hanson, 1993) y (7) síntesis de proteínas en la preimplantación de embriones de ratón *in vitro* (Anbari y Schultz, 1993). Dado que se han descrito muchas funciones para la Betaina, se han realizado varios estudios sobre las condiciones en las cuales se acumula y qué papel puede tener en el modelo de estudio.

**Betaina en microorganismos y plantas.** Se ha reportado que los microorganismos sometidos a un medio de cultivo con elevada osmolaridad, tales como *E. coli* y *S. typhimurium*, toman betaina del medio de cultivo para osmorregular o sintetizan betaina a partir de uno de sus precursores (colina o betaina aldehído), aunque éstos también tienen que tomarse del medio ambiente (Galinski y Trüper, 1982; Perroud y Le Rudulier, 1985; Cairney *et al.*, 1985a,b; Nicolaus *et al.*, 1989). En plantas de la familias Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Gramineae, y Leguminosae, entre otras, la betaina se acumula a niveles relativamente altos en el citoplasma y en los cloroplastos de las hojas (aproximadamente 300 mM) cuando son expuestas a salinidad con NaCl, déficit de agua o estrés por bajas temperaturas (Hanson y Hitz, 1982; Poljakoff-Mayber *et al.*, 1987; Arakawa *et al.*, 1990; Gamboa *et al.*, 1991; Rhodes y Hanson, 1993).

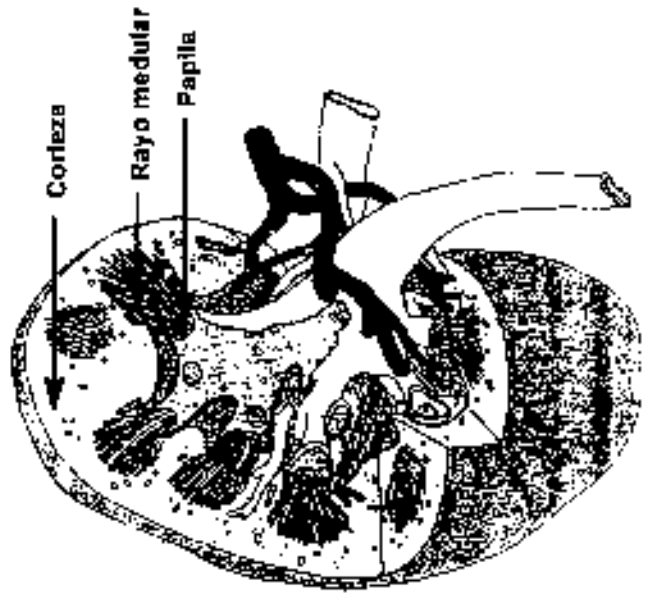
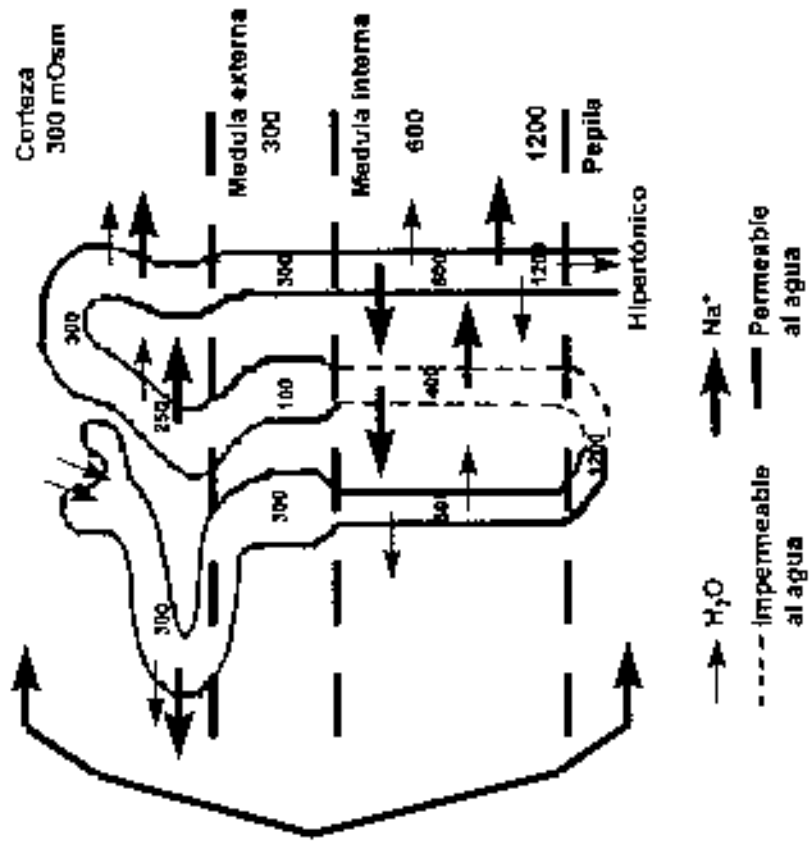
**Betaina en mamíferos.** Este compuesto se ha detectado tanto en el hígado como en el riñón de mamíferos. En el hígado, la betaina funciona como un donador de grupos metilo extremadamente eficiente para la síntesis de colina y creatina (Du Vigneaud *et al.*, 1946), así como también para la regeneración de moléculas de metionina (Muntz, 1949; Davies *et al.*, 1992). En el riñón, la betaina juega un papel significativo en el balance de la presión osmótica debido a las altas concentraciones de NaCl que normalmente se encuentran en el fluido tubular e intersticial como parte del mecanismo de concentración urinario (Bagnasco *et al.*, 1986; Gullans *et al.*, 1988; García-Pérez y Borg, 1991a; Nakanishi *et al.*, 1993). De hecho, la médula renal es el único tejido en mamíferos que normalmente experimenta grandes cambios de tonicidad (Handler y Kwon, 1993).



Entre la unión corticomedular y la papila existe un gradiente osmótico (Fig. 1). A medida que el filtrado glomerular avanza a través del túbulo proximal, la resorción de solutos y agua reduce mucho su volumen, mientras que se mantiene constante su osmolaridad. Sin embargo, al entrar en la rama descendente del asa de Henle, el filtrado comienza a aumentar de osmolaridad hasta que en la punta del asa, o la región de las papilas, la osmolaridad es varias veces más grande que la del plasma. Durante el paso a través de la rama ascendente, la orina sufre una reversión de osmolaridad debido a la resorción activa de partículas de sodio, de tal forma que la orina que entra en el túbulo contorneado distal es hipotónica en relación con el plasma y el líquido intersticial cortical. Sin embargo, la orina se vuelve nuevamente isotónica en la parte media del túbulo distal y como luego desciende por el túbulo colector, se vuelve concentrada una vez más (Berkow y Talbott, 1978; Potts y Parry, 1963). Durante todo este proceso, se ha reportado que la osmolaridad de la orina puede variar entre 300 y 2500 mOsm/L dependiendo del estado de hidratación y el balance de agua en el organismo (Beck *et al.*, 1985, 1988a,b).

Gruncwald y Eckstein (1995) han reportado que la síntesis de betaina es un componente importante de la regulación osmótica a largo plazo del contenido de betaina en cultivos celulares derivados de las asas de Henle de la médula externa, aunque otros mecanismos regulatorios, tales como el transporte de betaina, estén probablemente participando en la modulación del contenido de betaina intracelular siguiendo la estimulación osmótica. Además, se ha encontrado que la síntesis de betaina está influenciada por el contenido de betaina extracelular.

La síntesis y la acumulación de betaina, regulada osmóticamente, están separadas dentro de diferentes compartimentos del riñón, ya que el contenido de



A

B

Figura 1. Sección sagital del riñón (A) y esquema del mecanismo de concentración de orina (B)  
Fuente: Berkow y Talbott, 1978

betaina es más bajo en la corteza que en la médula interna, pero su síntesis se encuentra principalmente en la corteza y en la médula externa (Yancey y Burg, 1989; Guder *et al.*, 1990; Möckel *et al.*, 1993; Grunewald y Eckstecin, 1995). La síntesis de betaina principalmente ocurre en el túbulo proximal, aunque también se sintetiza en las células del conducto colector de la médula interna (Wirthensohn y Guder, 1982; Schmolke *et al.*, 1991).

El estudio de las enzimas involucradas en la síntesis de betaina, como respuesta a los cambios osmóticos que sufren diversos organismos, ha sido centro de atención en mucha investigación en plantas y microorganismos. Sin embargo, poco es lo que se conoce acerca de estas enzimas en las células de la médula renal de mamíferos.

#### Síntesis Enzimática de Betaina

Actualmente se sabe que la conversión de colina a betaina es catalizada por un sistema enzimático que involucra dos etapas de oxidación de colina (Fig. 2). En la primera etapa, la colina es oxidada a betaina aldehído por la enzima colina deshidrogenasa (E.C. 1.1.99.1), la cual está presente en la membrana interna de la mitocondria de los animales (Chi-Shui y Ru-Dan, 1986) o por la colina monooxigenasa, la cual se encuentra en el estroma de los cloroplastos de las hojas de algunas plantas (Brouquisse *et al.*, 1989).

En la segunda etapa la betaina aldehído es oxidada a betaina por la enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH, E.C. 1.2.1.8, betaina aldehído:NAD<sup>+</sup> oxido reductasa), la cual es predominantemente citoplasmática en animales y microorganismos (excepto en *L. polyphemus* que es mayoritariamente mitocondrial) (Horton y Barrett, 1975, Koivula y Koivusalo, 1975, Choquet *et al.*,



1991; Dragolovich y Pierce, 1994; Grunewald y Eckstein, 1995) y cloroplástica en plantas (Brouquisse *et al.*, 1989; Weretilnyk y Hanson 1989).

### **Betaina Aldehído Deshidrogenasa (BADH).**

Esta deshidrogenasa ha sido purificada a homogeneidad y caracterizada en algunas plantas (Arakawa *et al.*, 1987; Pan, 1988; Weretilnyk y Hanson, 1989; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), bacterias (Nagasawa *et al.*, 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992) y hongos (Mori *et al.*, 1980). En mamíferos, hasta antes de efectuar este trabajo, no se había purificado la BADH. Sin embargo, Chern y Pietruszko (1995) descubrieron que la isoenzima E<sub>3</sub> de la aldehído deshidrogenasa de hígado humano tiene actividad de BADH, aunque como tal, solo ha sido caracterizada parcialmente. Por otro lado, la BADH nunca ha sido purificada a partir de riñón, y por lo tanto, se carece de información de esta enzima que participa directamente en osmorregulación renal.

En plantas de amaranto y espinaca se ha reportado que la BADH se agrega como tetrámero (250 kDa) y como dímero (125 kDa), siendo este último la forma activa de la enzima (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Arakawa *et al.*, 1987). En microorganismos la BADH activa es un tetrámero de aproximadamente 216 kDa (Falkenberg y Strom, 1990, Mori *et al.*, 1980).

La enzima BADH presenta actividad en un rango muy amplio de pH (5.0-10.0); sin embargo el pH óptimo se encuentra del lado alcalino (7.5-9.5). Es altamente específica para el sustrato betaina aldehído en espinaca, amaranto, *E. coli* y *X. translucens*, utilizando como cofactor preferentemente NAD<sup>+</sup> en vez de NADP<sup>+</sup>. Además, la oxidación de betaina aldehído por BADH es irreversible en *P. aeruginosa*, *E. coli*, espinaca y amaranto (Nagasawa *et al.*, 1976; Pan, 1988;

Weretilnyk y Hanson, 1989; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Se ha reportado que esta enzima en microorganismos como *E. coli* y *C. didymum* presenta un mecanismo Ping Pong (Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1980), mientras que en plantas como amaranto, la enzima sigue un mecanismo Iso Bi Bi ordenado (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

La secuencia de aminoácidos de la BADH de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1990), betabel (McCue y Hanson, 1990) y *E. coli* (Boyd *et al.*, 1991) se dedujo a partir del cDNA. En dicha secuencia se encontró una región de diez aminoácidos altamente conservada entre las aldehído deshidrogenasas que se compararon, Val-Thr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Lys-Ser-Pro, así como también un residuo cisteína localizado a 34 residuos del decapeptido (Weretilnyk y Hanson, 1990) por lo cual se ha propuesto que estos residuos pudieran estar involucrados en el sitio activo de la BADH, aunque histidina y arginina pudieran ser también esenciales para la actividad enzimática (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de la Materia Prima

Se utilizaron riñones de puerco recientemente sacrificados en el rastro y se trasladaron en hielo al laboratorio del C.I.A.D., para ser luego cortados en pequeñas piezas y congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### Extracción y Purificación de la Enzima

Este procedimiento se basó en la metodología propuesta por Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1994). Todas las operaciones se ejecutaron de  $0 - 4^{\circ}\text{C}$ , excepto la cromatografía de afinidad. Se utilizaron 41.2 g de riñón de puerco, los cuales se homogenizaron con 80 mL de buffer Tris 0.1 M (pH 8.5) conteniendo EDTA 1 mM, glicerol al 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM, durante 3 tiempos de 15 segundos. El homogenado se filtró a través de varias capas de gasa y se centrifugó a  $48,400 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. La fracción sobrenadante se llevó a 40% de saturación con sulfato de amonio y se centrifugó a  $35,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Luego, nuevamente el sobrenadante obtenido se saturó con sulfato de amonio hasta 55% y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

El precipitado resultante de la segunda precipitación con sulfato de amonio, se resuspendió con buffer HEPES-KOH 10 mM (pH 7.9) conteniendo glicerol al 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM y se desaló por filtración en gel en una columna con Sephadex G-75 (37 x 2.5 cm) que se equilibró y eluyó con dicho buffer. Posteriormente, el eluato obtenido se aplicó a una columna de intercambio iónico con Q-Sepharosa de flujo rápido (10.5 x 2.5 cm) equilibrada con el buffer HEPES-

KOH que contenía además KCl 50 mM. Después del lavado de la columna con dicho buffer, la enzima se eluyó utilizando un gradiente lineal de KCl (50-300 mM) en buffer Hepes-KOH.

Las fracciones del pico con actividad enzimática de la columna de intercambio iónico, se juntaron y se desalaron en una columna con Sephadex G-25 (37 x 2.5 cm), equilibrada y eluida con buffer de fosfato 10 mM (pH 6.6) conteniendo glicerol al 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM. La fracción desalada se aplicó a una columna de afinidad con 5'-AMP Sepharosa (1 mL de cama) equilibrada con el buffer de fosfato a temperatura ambiente. Después de lavar la columna con dicho buffer, la enzima se eluyó con el buffer de fosfato que contenía AMP 0.125 mM. La muestra ya purificada se almacenó con glicerol al 25% a -70°C hasta su utilización.

#### Ensayo de Actividad Enzimática

La actividad enzimática de la BADH se determinó espectrofotométricamente midiendo la reducción de  $\text{NAD}^+$  por el incremento en la extinción a 340 nm en un espectrofotómetro Varian, Cary 1. La mezcla de ensayo tenía un volumen final de reacción de 0.8 mL, el cual contenía buffer Hepes-KOH 100 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, Betaina Aldehído (BA) 0.5 mM y  $\text{NAD}^+$  1 mM. La reacción se inició con la adición de la enzima (0.128  $\mu\text{g}$ ). Cada determinación se hizo al menos por duplicado. Las velocidades de las reacciones fueron lineales en un periodo de ensayo de 7 minutos. La actividad se expresó como  $\mu\text{moles de NADH producidos/min/mg proteína (U/mg proteína)}$



### Determinación de Proteína

La concentración de proteína de cada etapa de la purificación se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

### Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

La pureza de la enzima se corroboró por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE nativo) y desnaturalizantes y reductoras, utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a Laemmli (1970). El PAGE nativo y el SDS-PAGE se corrieron en un sistema Phast (Pharmacia LKB), utilizando un gel en gradiente de 4-15% de acrilamida-bisacrilamida e inyectando 12.8 ng de proteína por pozo. Las bandas de proteína se detectaron mediante la tinción de plata de acuerdo al método de Wray *et al.* (1981). La actividad de la BADH se detectó en el PAGE nativo por incubación del mismo a 37°C con buffer Hepes-KOH 100 mM (pH 8.0), conteniendo BA 0.5 mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, 0.33 mg/mL de fenazina metasulfato y 0.3 mg/mL de azul de tetrazolium en un volumen final de 20 mL de acuerdo a Arakawa *et al.* (1990).

### Estimación de Masa Molecular Aparente

Se estimó la masa molecular aparente de la enzima nativa por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna de filtración en gel TSKG 3000 SWXL, utilizando como proteínas estándares apoferritina (443 kDa),  $\beta$ -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). También, mediante PAGE nativo, se estimó la masa molecular

aparente, utilizando como proteínas estándares ureasa (545 y 272 kDa) y albúmina de suero bovino (132 y 66 kDa).

La masa molecular por subunidad de la enzima se estimó por SDS-PAGE utilizando como proteínas estándares miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116.25kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina de suero bovino (66.2 kDa), ovoalbumina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa).

#### Estabilidad al pH y pH Optimo

Se determinó la estabilidad de la enzima (0.128  $\mu$ g) al pH, manteniéndola por 10 minutos a temperatura ambiente en 20  $\mu$ L de los siguientes bufferes: citrato (pH 5.5), fosfato (pH 6.0-7.5), Hepes (pH 8.0), Tricina (pH 8.5) y glicina (pH 9.0-10.0). La actividad remanente se midió inmediatamente después de estos tratamientos, utilizando el ensayo de actividad descrito anteriormente. El pH óptimo de actividad de la enzima también se determinó utilizando los siguientes bufferes: citrato (5.0 y 5.5), pirofosfato (9.0-10.0), fosfato (6.0-7.5), Hepes-KOH (7.5-8.5), Tricina (8.5 y 9.0), glicina (9.0-1.0), borax (9.0-9.5) y carbonato-bicarbonato (9.5 y 10.0).

#### Especificidad por Sustratos

La especificidad de la enzima por sus sustratos se determinó utilizando los siguientes aldehidos: gliceraldehído, butiraldehído, acetaldehído, glutaraldehído, benzaldehído, formaldehído, succínico semialdehído, gliceraldehído 3-fosfato y etanol. Todos ellos se probaron a una concentración de 0.5 mM en el ensayo estándar, el cual contenía  $\text{NAD}^+$  1 mM.

Para probar la especificidad de la enzima por su coenzima, se midió su actividad con NADP<sup>+</sup> a una concentración de 1 y 10 mM en el ensayo estándar, el cual contenía BA 0.5 mM.

### Efecto de Cationes y Solutos Compatibles

El efecto de cationes monovalentes y divalentes, así como de solutos compatibles se determinó utilizando concentraciones saturantes de BA (0.5 mM) y NAD<sup>+</sup> (1 mM) y concentraciones subsaturantes de BA y NAD<sup>+</sup> (0.05 mM para ambos sustratos) en el ensayo de actividad. Como cationes monovalentes se utilizaron NaCl, NH<sub>4</sub>Cl y KCl, mientras que como catión divalente al MgCl<sub>2</sub>. Los solutos orgánicos compatibles fueron prolina, glicerol, sacarosa, manitol y betaina. Todos estos compuestos se probaron a concentraciones que fueron de 0 a 1 M en el ensayo de actividad.

### Análisis Cinético

Los datos cinéticos se analizaron en dos pasos. Primero, los datos experimentales obtenidos a concentraciones fijas de un sustrato y variable la concentración del otro sustrato (0.025-0.5 mM), se ajustaron a la ecuación de Michelis-Menten (Ecuación 1), utilizando el programa de análisis de regresión no lineal desarrollado por R.J. Leatherbarrow (Enzfitter, Elsevier-Biosoft, 1987). Posteriormente, la constante cinética aparente obtenida de esas gráficas fue ajustada a la ecuación de una hipérbola rectangular (Ecuación 2 y 3) para los datos que conforman un mecanismo secuencial. Los regráficos de la pendiente ( $K_m/V_{max}$ ) y los interceptos vs el inverso de la concentración de cada uno de los sustratos se utilizaron para calcular las constantes cinéticas  $K_{m(NAD)}$ ,  $K_{m(BA)}$ , de acuerdo a las

ecuaciones 2 y 3, donde  $K_{m(NAD)}$  y  $K_{m(BA)}$  son las constantes de Michaelis-Menten para los sustratos  $NAD^+$  y BA, y  $V_{max}$  es la velocidad máxima.

Ecuación 1

$$\frac{v}{V_{max,sp}} = \frac{[A]}{K_{A,sp} + [A]}$$

Ecuación 2

$$V_{max,sp} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_A}{[A]}}$$

Ecuación 3

$$V_{max,sp} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]}}$$

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Purificación de la Enzima

La Tabla I muestra el esquema de purificación utilizado para la enzima BADH de riñón de puerco. La enzima se purificó a homogeneidad electroforética aparente en cuatro etapas consecutivas: precipitación fraccional con sulfato de amonio, filtración en gel en Sephadex G-75, intercambio iónico en Q-Sepharosa Fast-Flow y cromatografía de afinidad en 5'-AMP Sepharosa. Con esta última etapa se logró obtener una actividad total de 3.02 U y una actividad específica de 6.9 U/mg proteína, lo cual representó una recuperación de 11% y un factor de purificación de 329. La metodología de purificación utilizada en este estudio es mucho más simple que las reportadas para la BADH de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976) y espinaca (Arakawa *et al.*, 1987, Weretilnyk y Hanson, 1989), así como para la de la isoenzima E<sub>2</sub> de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) de hígado humano, actualmente reportada como BADH (Chern y Pietruszko, 1995), donde se llegan a utilizar hasta 7 pasos de purificación.

Se demostró que la enzima de riñón se purificó a homogeneidad, ya que en la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas se observó una sola banda cuando se tiñó con plata (Fig. 3A) así como con la tinción por actividad (Fig. 3B). Además, la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y reductoras también mostró una sola banda cuando se tiñó con plata (Fig. 4).

**Tabla I. Purificación de la BADH de Riñón de Puerco<sup>a</sup>**

Etapa de Purificación	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U) <sup>b</sup>	Actividad Específica (U/mg prot.)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
Extracto crudo	1312.65	27.79	0.0211	1.0	100
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	309.39	12.66	0.0409	2.0	46
Sephadex G-75	153.55	9.99	0.0650	3.0	36
Q-Sepharosa	10.99	6.59	0.6003	28.0	24
S <sup>-</sup> -AMP Sepharosa	0.43	3.02	6.9457	329.0	11

<sup>a</sup> Preparada de 41.2 g de riñón de puerco

<sup>b</sup> Una unidad (U) es la cantidad de enzima requerida para la conversión de 1µmol de NAD<sup>+</sup> a NADH/min

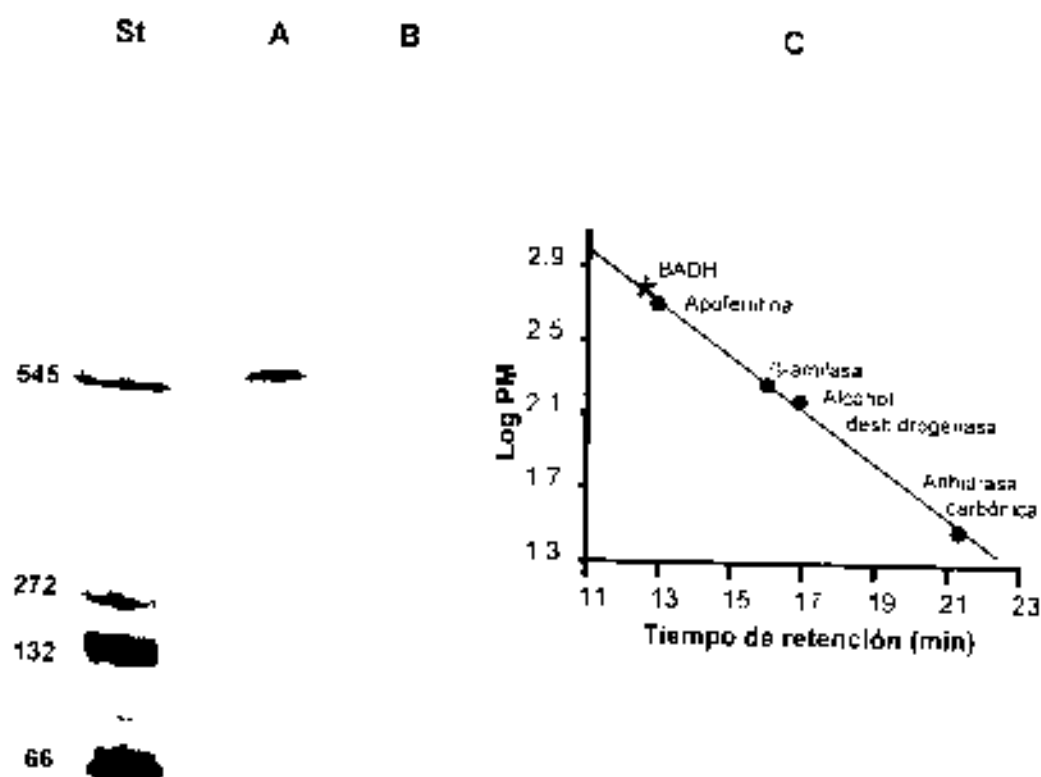


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas de la BADH de riñón de puerco. (A) tinción con plata. (B) tinción por actividad y (C) estimación de la masa molecular aparente por HPLC.

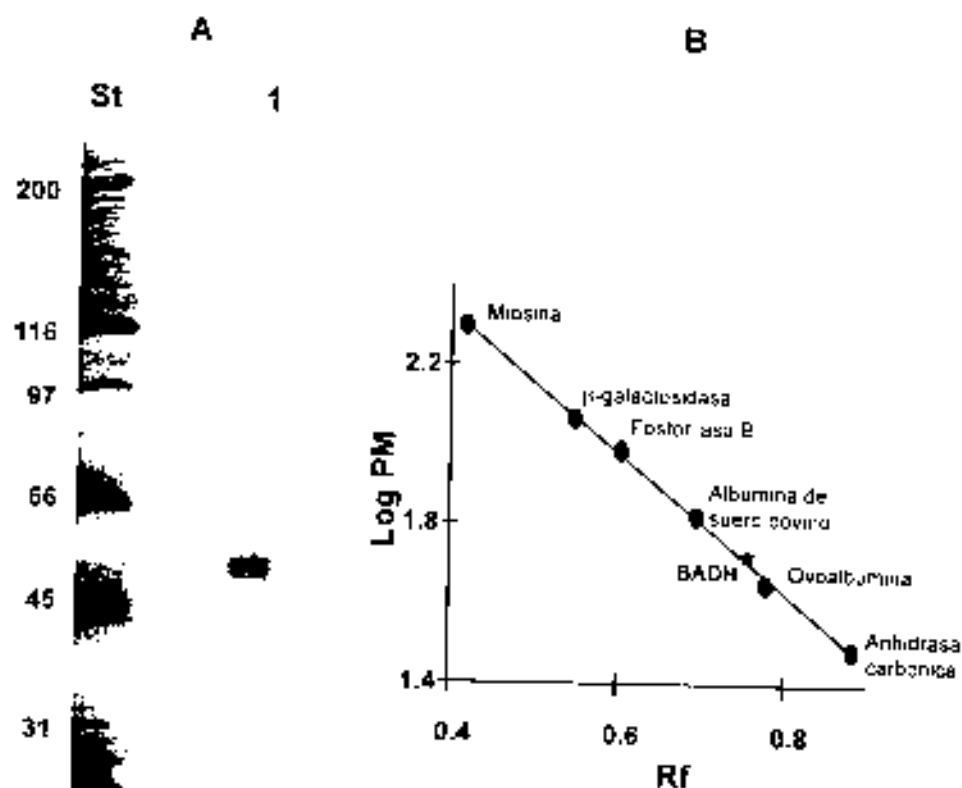


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y reductoras de la BADH de riñón de puerco. (A St) estándares de peso molecular. (A1) enzima de riñón y (B) estimación de la masa molecular aparente por subunidad.



### Estimación de la Masa Molecular

Mediante filtración en gel en HPLC se estimó que la masa molecular aparente de la enzima fue de 667 kDa (Fig. 3A) y mediante PAGE nativo fue de 688 kDa, con subunidades de masa molecular de 52 kDa, debido a la presencia de una sola banda en electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Fig. 4). Sin embargo a la fecha no han sido reportadas BADH's o ALDH's de otras fuentes con pesos moleculares por arriba de los 265 kDa (Mori *et al.*, 1980; Lindahl y Evces. 1984; Creaser *et al.*, 1987; Kurys *et al.*, 1989; Falkenberg y Strom, 1990, Abe *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz-Claros, 1994; Chern y Pietruszko, 1995).

### pH Optimo y Estabilidad al pH

En la Fig. 5 se muestra que para la mayoría de los buffers utilizados, la actividad de la enzima de riñón aumentó conforme el pH fue incrementándose. Además, a un mismo pH, el tipo de buffer utilizado tuvo influencia en la actividad de la enzima.

A pH 5, la actividad fue nula, pero a partir de pH 5.5 alcanzó aproximadamente el 60% de la actividad del control (buffer Hepes, pH 8.0), a diferencia de la BADH de hígado de rata, que a pH's por debajo de 7 la actividad se reduce al mínimo (Rothschild y Guzman Barron, 1954).

La máxima actividad de la enzima se alcanzó a pH 9.5 en buffer de glicina, la cual representó aproximadamente el doble de la actividad del control (Buffer Hepes, pH 8.0) Al comparar estos resultados con los de otras BADH's procedentes de microorganismos (Nagasawa *et al.*, 1976; Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strom, 1990), plantas (Pan, 1988; Weretilnyk y Hanson, 1989;

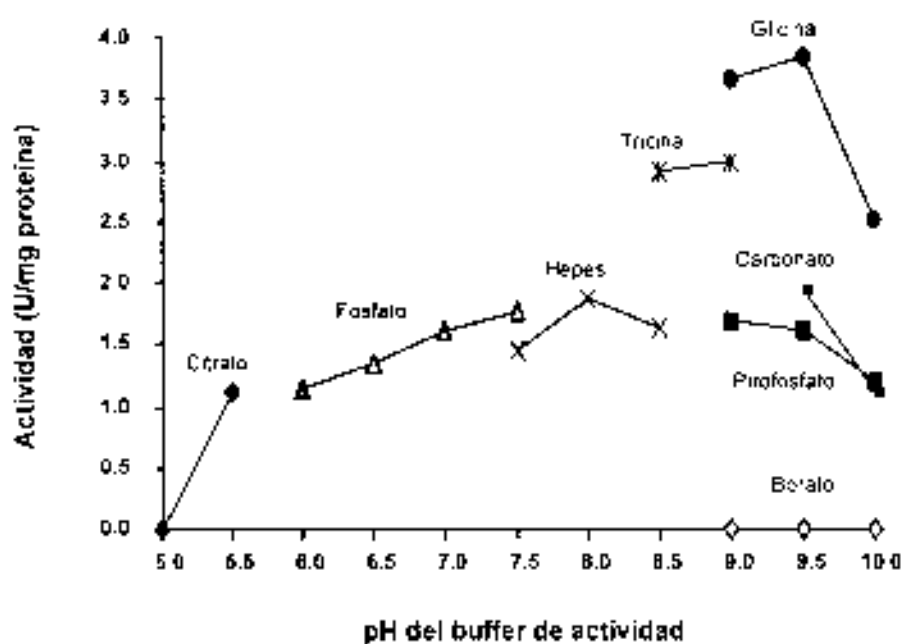


Figura 5. Efecto del pH y tipo de buffer en la actividad de la BADH de riñón de puerco.

Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) e hígado de mamíferos (Rothschild y Guzman-Barron, 1954; Goldberg y Mc Caman, 1968; Chern y Pietruszco, 1995), se encontró que estas tienen pH's de actividad óptima por arriba de 7. Además, se observó que en buffer de boratos, aunque se tuvieron pH's muy altos, la enzima de riñón se inhibió completamente a todos los valores probados. Por arriba de pH 9.5 la actividad se vio reducida drásticamente con todos los buffers, probablemente debido a que pH's tan alcalinos desestabilizan la estructura de la enzima.

Aún cuando el rango de pH de la orina normalmente puede oscilar entre 4.5 y 8.0, debido al proceso de ajuste efectuado por el riñón en la concentración de iones hidrógeno en el fluido extracelular, el pH intracelular solamente se encuentra entre 6.0 y 7.4 en diferentes células, ya que ligeros cambios en la concentración de iones  $H^+$  del valor normal puede causar marcadas alteraciones en las velocidades de las reacciones químicas en las células, algunas siendo deprimidas y otras aceleradas (Guyton, 1981). Sin embargo, la BADH de riñón, la cual se sabe se encuentra en las células de los túbulos proximales y de los conductos colectores (Wirthensohn y Guder, 1982; Schmolke *et al.*, 1991), mostró en los estudios de estabilidad que puede mantener su actividad en el rango de pH de 5.5 hasta 10.

#### Especificidad por Sustratos

Se determinó la especificidad de la enzima por su sustrato aldehído, utilizando los siguientes compuestos: gliceraldehído, butiraldehído, acetaldehído, glutaraldehído, benzaldehído, formaldehído, succinico semialdehído y gliceraldehído-3-fosfato (Fig. 6). Se encontró que la enzima de riñón es altamente específica para el sustrato BA, aunque también puede utilizar butiraldehído,

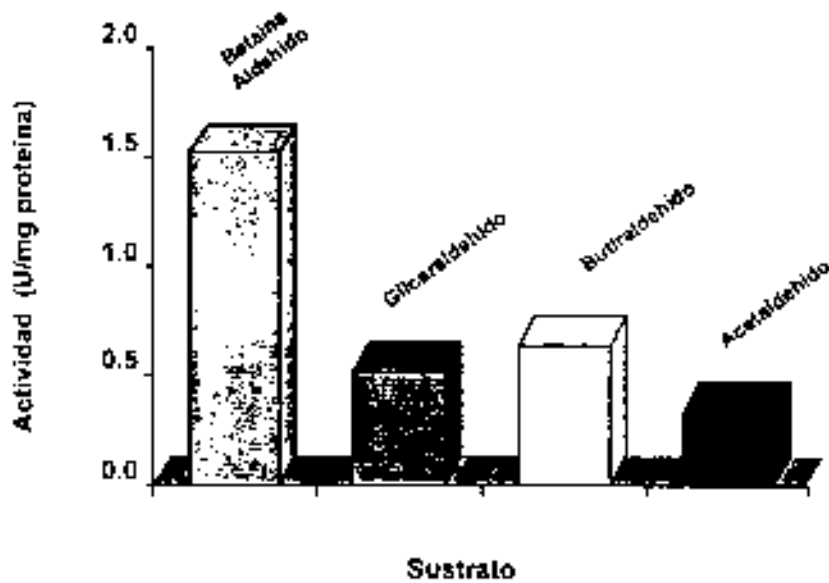


Figura 6. Especificidad por sustratos de la BADH de riñón de puerco.

gliceraldehído y acetaldehído con menor eficiencia con respecto a BA. Al parecer, la actividad de la enzima con estos tres sustratos está en función del número de carbonos de la cadena alifática, donde a mayor número de carbonos, la actividad va en aumento, tal como se ha reportado para la isoenzima E<sub>4</sub> de la ALDH de hígado humano (Ambroziak y Pietruszko, 1991). Con el resto de los sustratos aldehído y con etanol, la enzima no efectuó la reacción de oxidación. Esta relativa especificidad de la enzima también se ha reportado para BADH de hígado humano (isoenzima E<sub>4</sub>), la cual es considerada una ALDH con actividad de BADH (Chern y Pietruszko, 1995). Sin embargo, para la mayoría de la BADH's de diversas fuentes, la especificidad por el sustrato BA es única (Falkenberg y Strom, 1990; Arakawa *et al.*, 1990; Dragolovich y Pierce, 1994).

La enzima de riñón es específica para NAD<sup>+</sup>, ya que no presentó actividad con NADP<sup>+</sup>, aun cuando se utilizó una concentración de NADP<sup>+</sup> de 10 mM en los ensayos de actividad. Se sabe que el requerimiento de la coenzima entre las diversos organismos es diferente. En general, las ALDH's de mamíferos requieren solamente de NAD<sup>+</sup>, pero en los sistemas bacterianos y en plantas la BADH es activa tanto con NAD<sup>+</sup> como NADP<sup>+</sup>, aunque preferentemente utilizan el primero (Nagasawa *et al.*, 1976; Weretilnyk y Hanson, 1989; Dickinson, 1989; Falkenberg y Strom, 1990).

La BADH de riñón fue incapaz de catalizar la reacción reversible, es decir, no puede utilizar Betaina y NADH como sustratos, a concentraciones de 0.5 y 1 mM, respectivamente. Estos resultados concuerdan con las BADH's de plantas (Pan *et al.*, 1981; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y microorganismos (Nagasawa *et al.*, 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992), así como también la ALDH de hígado de caballo (Feldman y Weiner, 1972)

### Efecto de Cationes y Solutos Orgánicos Compatibles

Se midió el efecto de los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ , comúnmente encontrados en las células sometidas a estrés osmótico, y divalentes como  $\text{Mg}^{++}$ , sobre la actividad de la enzima, con el fin de estudiar su posible regulación por alguno de ellos. El estudio se hizo bajo dos condiciones, una a concentraciones saturantes de sustratos, y la otra a concentraciones subsaturantes de sustratos. Esta última condición se hizo con la idea de simular las concentraciones de los sustratos de la BADH que pudieran existir *in vivo*.

El efecto de cationes monovalentes en la actividad de la enzima a concentraciones saturantes de sustratos se muestra en la Fig. 7. El  $\text{NaCl}$  y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tuvieron un efecto ligeramente activador a concentraciones de 0.1 y 0.2 M respectivamente; sin embargo, a concentraciones mayores redujeron su actividad hasta aproximadamente un 40 y 60%, respectivamente. Contrariamente, el  $\text{KCl}$  disminuyó la actividad de la enzima a todas las concentraciones probadas, quedando poco más del 60% de la actividad después de 0.4 M, pero sin mayor efecto a concentraciones mayores (hasta 1 M).

A concentraciones subsaturantes de sustratos (Fig. 8), el efecto de estos iones se invirtió, es decir, el  $\text{KCl}$  fue el único que presentó un efecto activador hasta 0.1 M, pero a concentraciones más altas se redujo la actividad de la enzima hasta aproximadamente un 50%. El  $\text{NaCl}$  y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  redujeron la actividad de la enzima a todas las concentraciones probadas, aunque el efecto más drástico lo mostró el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ya que a una concentración de 0.3 M se ha perdido el 50% de la actividad, mientras que con  $\text{NaCl}$ , a esta misma concentración, se pierde el 50% de la actividad.

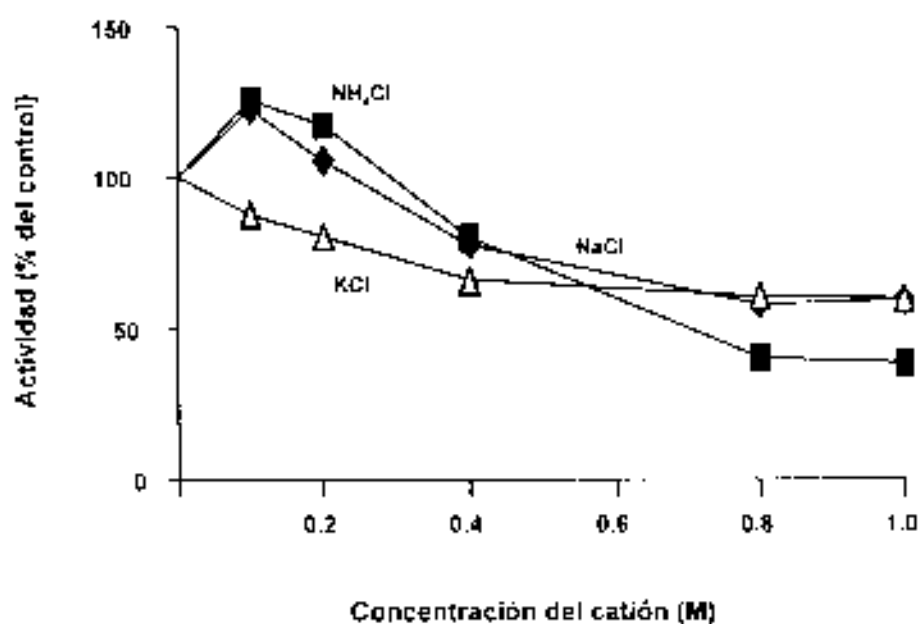


Figura 7. Efecto de los cationes monovalentes a concentraciones saturantes de BA y NAD<sup>+</sup> sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco.

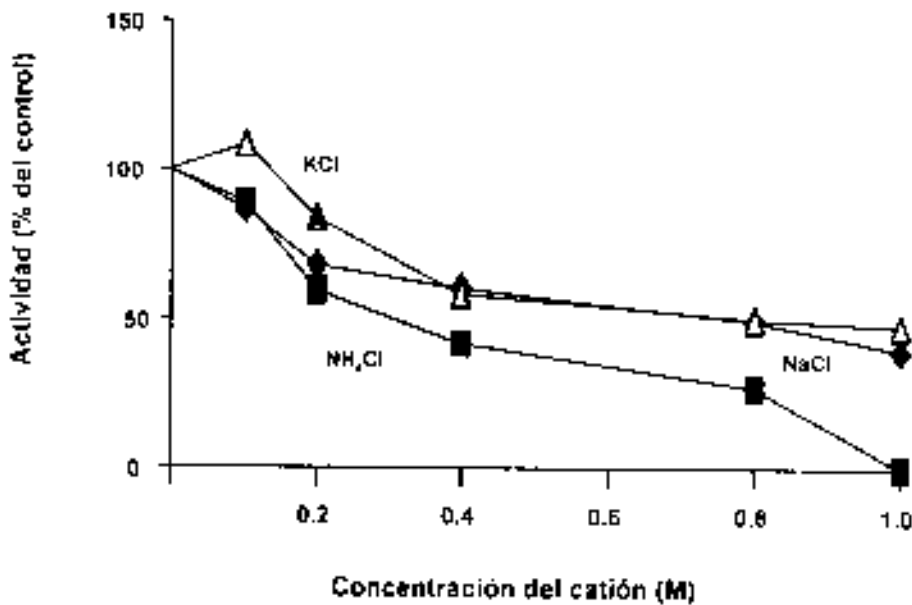


Figura 8. Efecto de los cationes monovalentes a concentraciones subsaturantes de BA y NAD<sup>+</sup> sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco.



Con respecto al efecto del catión divalente en la actividad de la enzima, éste se muestra en la Fig. 9. A concentraciones saturantes de sustratos, el  $Mg^{++}$  tuvo un efecto ligeramente activador en la enzima a 0.1 M, pero a concentraciones más altas, la actividad se redujo hasta aproximadamente un 60%. A concentraciones subsaturantes de sustratos (Fig. 9), el  $Mg^{++}$  inhibió drásticamente la actividad de la enzima, perdiéndose totalmente a 0.4 M.

Se observa que el efecto de los cationes a concentraciones saturantes de sustratos muestran resultados opuestos a los de concentraciones subsaturantes. Este comportamiento se puede deber a que las altas concentraciones de sustratos tienen un efecto protector en el sitio activo de la enzima, permitiendo una mayor posibilidad de reacción enzimática, aún ante los posibles efectos dañinos que pudieran ejercer sobre la actividad las sales que se encuentran a altas concentraciones. En cambio, a bajas concentraciones de sustratos, el sitio activo de la enzima se encuentra más desprotegido y expuesto al efecto dañino de las altas concentraciones de las sales.

Un propósito de este estudio fue determinar si la acumulación de betaina puede ser regulada a través de la BADI, ya que se ha propuesto que las enzimas que están involucradas en la síntesis de solutos compatibles podrían ser capaces de funcionar en medios con altas fuerzas iónicas y podrían ser aún activadas bajo tales condiciones (Beck *et al.*, 1992). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, indican que los efectos de las sales no son debidos a la fuerza iónica, y al parecer, se encuentran operando efectos específicos que hacen difícil asegurar su significado fisiológico.

Se sabe que el sistema de concentración urinario permite alcanzar concentraciones muy altas de sodio en los fluidos tubulares e intersticiales, aunque

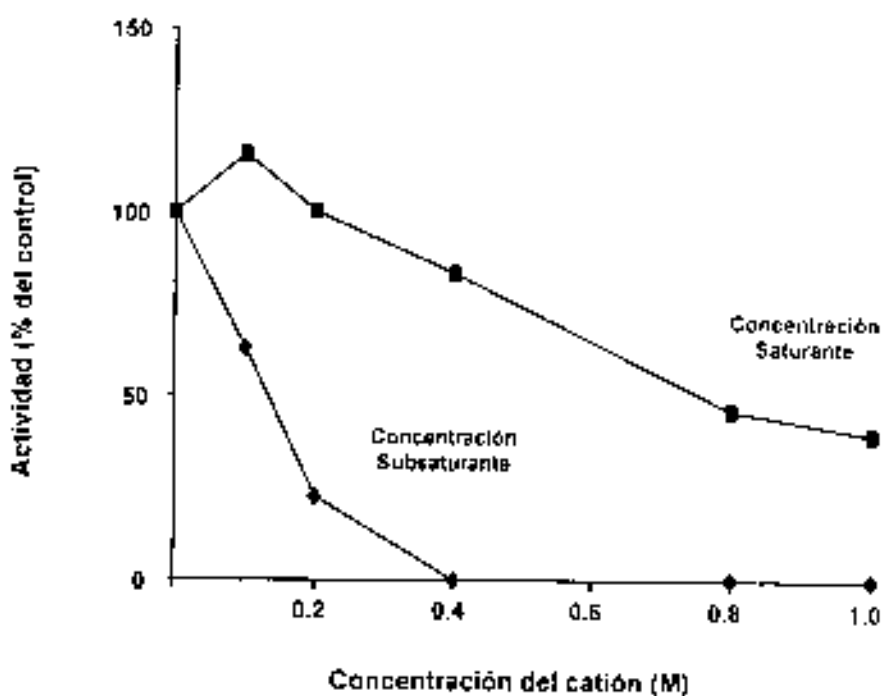


Figura 9. Efecto del  $MgCl_2$  (catión divalente) a concentraciones saturantes y subsaturantes de BA y  $NAD^+$  sobre la actividad de la BATH de riñón de puerco.

el transporte como tal no tiene forzosamente la capacidad de establecer diferencias de concentración tan grandes como las que existen entre el plasma sanguíneo (0.15 M) y la orina final (1 M). Es decir, las células de la rama ascendente en ningún lugar transportan sodio sobre un gradiente mayor que 0.1 M (Schmidt-Nielsen, 1981). Por lo tanto, no es extraño encontrar que la enzima de riñón pueda seguir reteniendo actividad a esta concentración, y que aún a concentraciones superiores de NaCl la siga manteniendo, aunque a velocidades subóptimas. Sin embargo, a las concentraciones de NaCl probadas en este estudio, no se muestra algún efecto activador sobre la enzima.

Por otro lado, la activación de la enzima de riñón por KCl hasta los M pudiera reflejar una estabilización no específica de la enzima más que una respuesta específica *in vivo* al estrés osmótico, ya que esta concentración en la células de mamíferos (como el hombre) está muy por debajo de la concentración citoplasmática que se encuentra normalmente en las células sin estrés osmótico (Guyton, 1981). Se sabe que al haber un incremento en las concentraciones de NaCl intracelular se estimula a la ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  para eliminar  $\text{Na}^+$  y reemplazarlo por  $\text{K}^+$ . El efecto neto es entonces la ganancia temporal de KCl (Beck *et al.*, 1988a; Burg, 1988; Higgins *et al.*, 1987). Por esta razón, la BADH de riñón pudiera seguir manteniendo su actividad aún a concentraciones altas de KCl.

En cuanto al  $\text{NH}_4^+$  y el  $\text{Mg}^{++}$  no se ha reportado que tengan algún efecto sobre la acumulación de betaina. El  $\text{NH}_4^+$  se encuentra en la orina del hombre a concentraciones relativamente altas (aproximadamente 0.04 M) si se compara con la sangre, ya que se sintetiza en las células epiteliales de los túbulos renales como parte del sistema buffer que transporta el exceso de iones hidrógeno (Strand, 1983; Guyton, 1981). Sin embargo, el  $\text{NH}_4^+$  no se acumula intracelularmente debido a su

alta toxicidad, ya que se combina enzimáticamente con glutamato para producir glutamina y finalmente urea (Lehninger, 1982). No obstante, la enzima de riñón puede retener más del 50% de la actividad a 0.2 M de  $\text{NH}_4^+$ .

En cuanto al  $\text{Mg}^{2+}$ , es reabsorbido por todas las porciones de los túbulos renales y conductos colectores (Guyton, 1981). Sin embargo, intracelularmente este ión nunca llega a alcanzar concentraciones mayores a los 0.058 M (Guyton, 1981), y por lo tanto no es extraño encontrar que a concentraciones más altas la actividad de la enzima se reduzca, tal como se ha encontrado en este estudio.

Estos resultados de actividad de BADH en riñón por efecto de cationes monovalentes y divalentes concuerdan con los reportados para la BADH de *E. coli*, *L. polyphemus*, espinaca y amaranto, aunque las tres primeras fuentes manejaron concentraciones saturantes de sustratos (Falkenberg y Strom, 1990; Dragolovich y Pierce, 1994; Pan *et al.*, 1981; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

También se midió el efecto de algunos solutos orgánicos compatibles, comúnmente encontrados en las células en estrés osmótico, sobre la actividad de la enzima, utilizando concentraciones saturantes y subsaturantes de sustratos.

El efecto de solutos orgánicos prolina, glicerol, sacarosa y manitol sobre la actividad de la enzima a concentraciones saturantes de sustratos se muestra en la Fig. 10. Prolina tuvo un efecto ligeramente activador hasta 0.4 M, pero a concentraciones más altas, la actividad se redujo levemente, mostrando el 70% de la actividad a 1 M. Glicerol, sacarosa y manitol prácticamente no modificaron la actividad hasta los 0.2 M, pero a concentraciones superiores, se observó un efecto ligeramente inhibitor. Sin embargo, betaina redujo la actividad a todas las

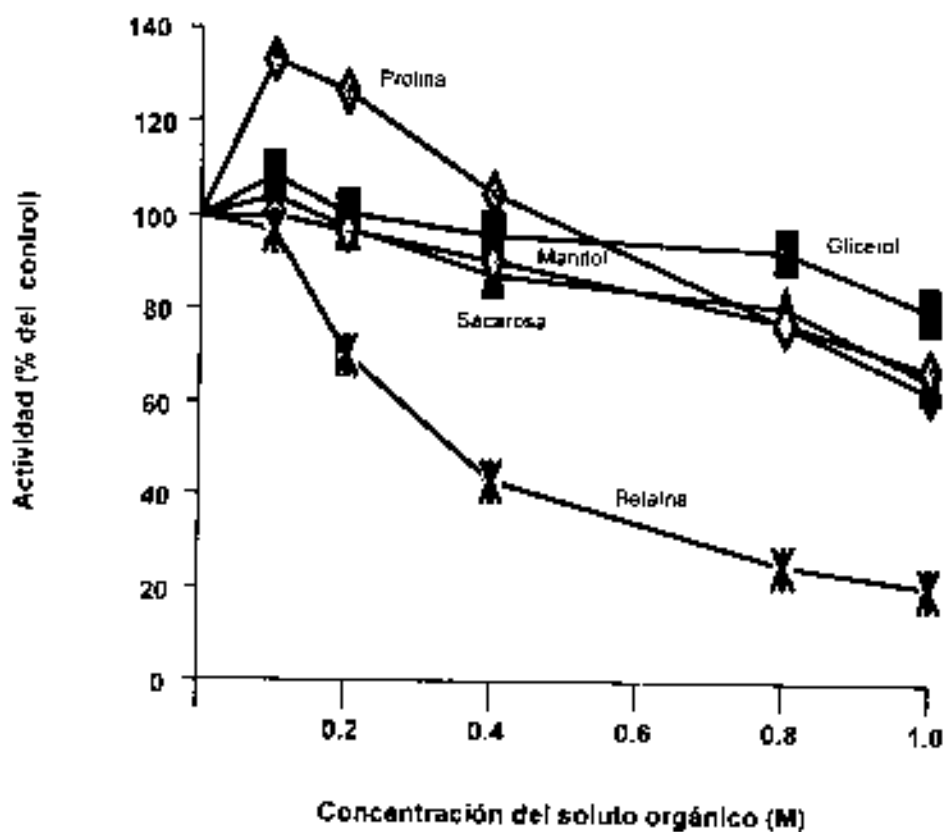


Figura 10. Efecto de los solutos orgánicos compatibles a concentraciones saturantes de BA y  $\text{NAD}^+$  sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco.

concentraciones probadas, perdiéndose aproximadamente el 80% de la actividad a 1 M.

A concentraciones subsaturantes de sustratos (Fig. 11) prolina redujo drásticamente la actividad de la enzima a diferencia de glicerol, manitol y sacarosa, los cuales la redujeron aproximadamente un 60%. Con betaina, el efecto inhibitorio fue más drástico que a concentraciones saturantes de sustrato a todas las concentraciones probadas.

De todos los solutos orgánicos probados a concentraciones subsaturantes, ninguno tuvo efecto activador en la enzima, aún a bajas concentraciones, donde betaina (producto de la reacción catalizada por BADH) mostró el mayor efecto inhibitorio.

Aún cuando se sabe que betaina se puede llegar a acumular a concentraciones de 5, 20, y 40 mmol/Kg peso húmedo en la corteza, médula externa y médula interna, respectivamente, en conejos sometidos a antidiuresis (Yancey y Burg, 1989), estas concentraciones están por debajo de la mínima concentración de betaina probada en este estudio. Sin embargo, si tales concentraciones se alcanzaran en el compartimento celular, donde se lleva a cabo la síntesis de betaina, la actividad de la BADH sería severamente inhibida a menos que existiera algún mecanismo que libere a la enzima de esta inhibición, como por ejemplo, la concentración de la BADH o la presencia de algún metabolito o ión. Para aclarar este punto, se requieren de más estudios sobre el mecanismo de inhibición por betaina. Estos resultados concuerdan con los reportados para *P. aeruginosa*, donde la BADH se inactiva *in vitro* después de los 10 mM de Betaina, y para amaranto, donde la enzima se inactiva después de los 50 mM de betaina,

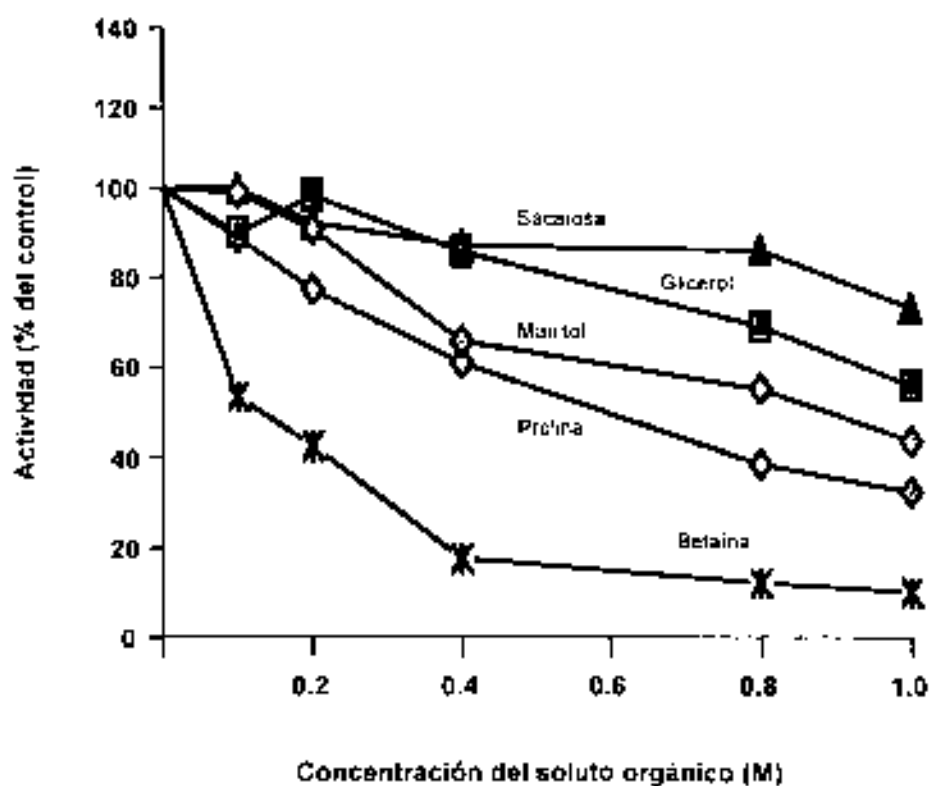


Figura 11. Efecto de los solutos orgánicos compatibles a concentraciones subsaturantes de BA y  $\text{NAD}^+$  sobre la actividad de la BADH de riñón de puerco.

aunque en las plantas las concentraciones de betaina en el cloroplasto pueden llegar a alcanzar los 300 mM (Robinson y Jones, 1986).

Con respecto al resto de los solutos orgánicos estudiados, en este trabajo, prácticamente no afectan la actividad de la enzima, aún a altas concentraciones. Incluso, glicerol, sacarosa y manitol son comúnmente utilizados en las técnicas de purificación de BADH de diversas fuentes (Dragolovich y Pierce, 1994; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Pan *et al.*, 1981; Mori *et al.*, 1980; Pan, 1988; Ambroziak y Piernuszko, 1991) para evitar la pérdida de su actividad

### Propiedades Cinéticas

Los patrones de velocidad inicial fueron obtenidos por medición de la actividad de la BADH variando las concentraciones de  $\text{NAD}^+$  o BA a varias concentraciones fijas del otro. Las gráficas de velocidad ( $v$ ) vs  $[\text{NAD}^+]$  o  $v$  vs  $[\text{BA}]$  en el rango de 0.025-0.5  $\mu\text{M}$  para ambos sustratos, siguieron una cinética típica de Michaelis-Menten (Fig. 12)

Las familias correspondientes de las gráficas de dobles recíprocos fueron lineales y dieron patrones de intersección normal (Fig. 13 y 14). Este resultado muestra que el mecanismo cinético Ping Pong puede ser descartado y el mecanismo deberá ser secuencial, ya sea ordenado en estado estacionario (steady state), ordenado en estado estacionario Theorell-Chance o al azar en equilibrio rápido (Cleland, 1963; Segel, 1975). Sin embargo, los resultados excluyen los dos primeros mecanismos, ya que las líneas en las gráficas recíprocas convergen en un punto común a la izquierda del eje  $-1/v$ , lo cual indica un mecanismo al azar en equilibrio rápido (Fig. 15). Los regráficos de la pendiente y los interceptos (Fig. 16



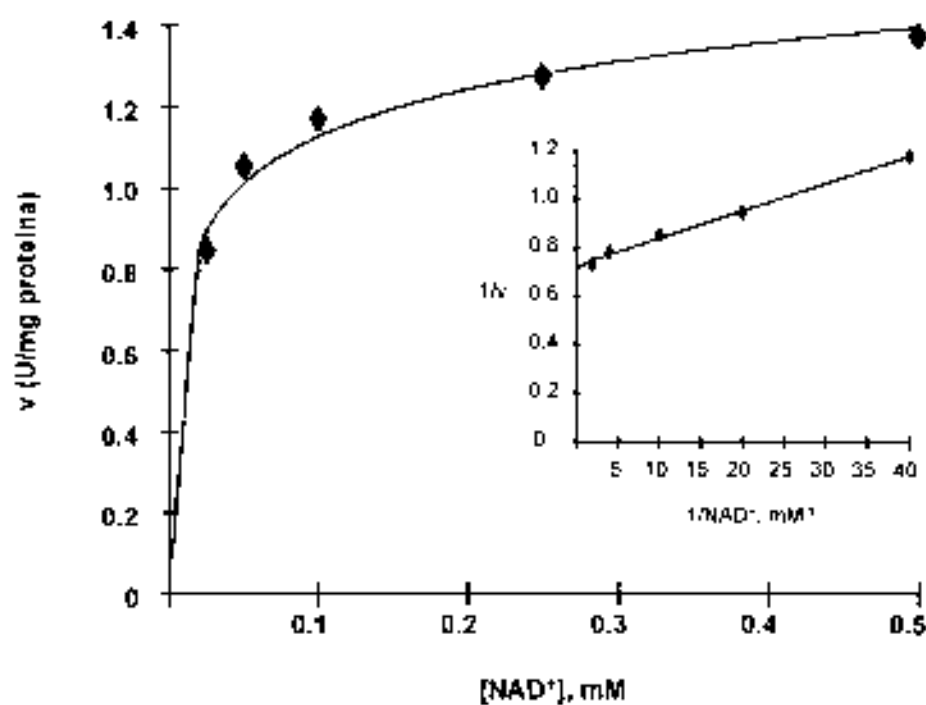


Figura 12. Representación de la velocidad de reacción,  $v$ , en función de la concentración de sustrato,  $[NAD^+]$ , para la enzima BADI1  
*Inserto*. gráfica de dobles recíprocos de los datos.

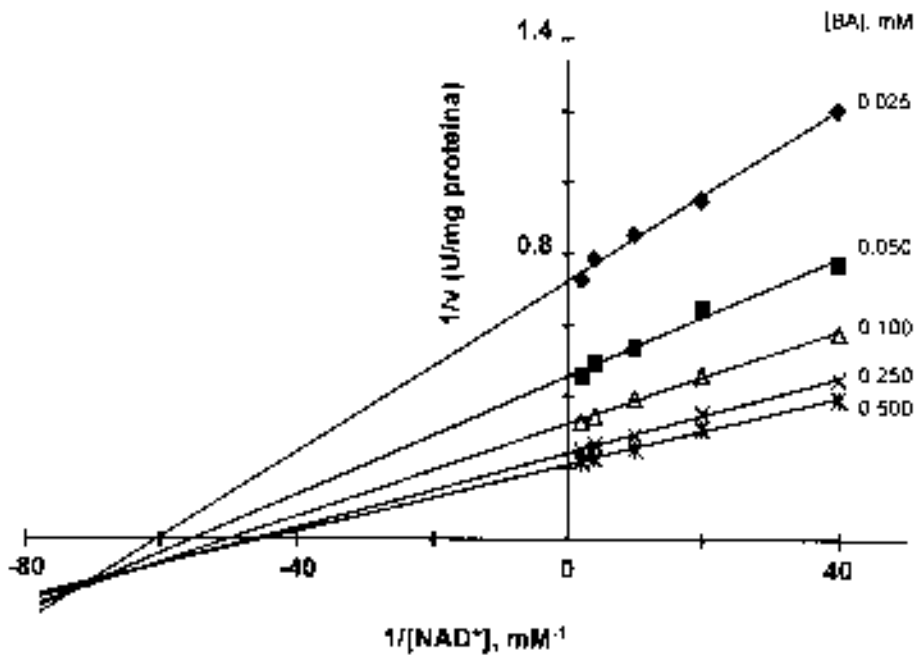


Figura 13. Patrones de velocidad inicial para la reacción de la BAD11 de riñón de puerco a concentraciones variables de  $NAD^+$  y fijas de BA.

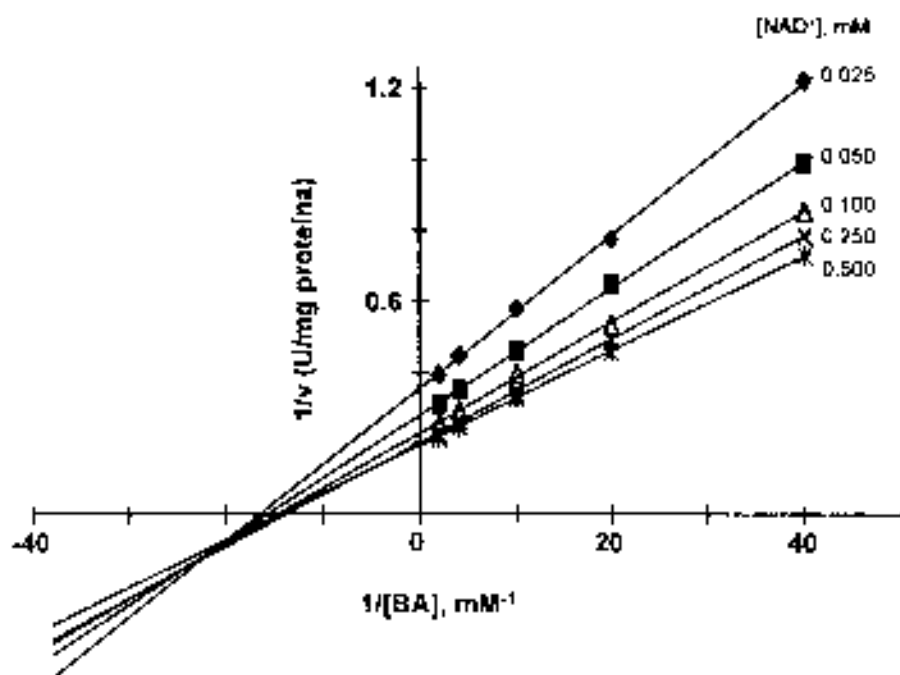


Figura 14. Patrones de velocidad inicial para la reacción de la BADH de riñón de puerco a concentraciones variables de BA y fijas de NAD<sup>+</sup>

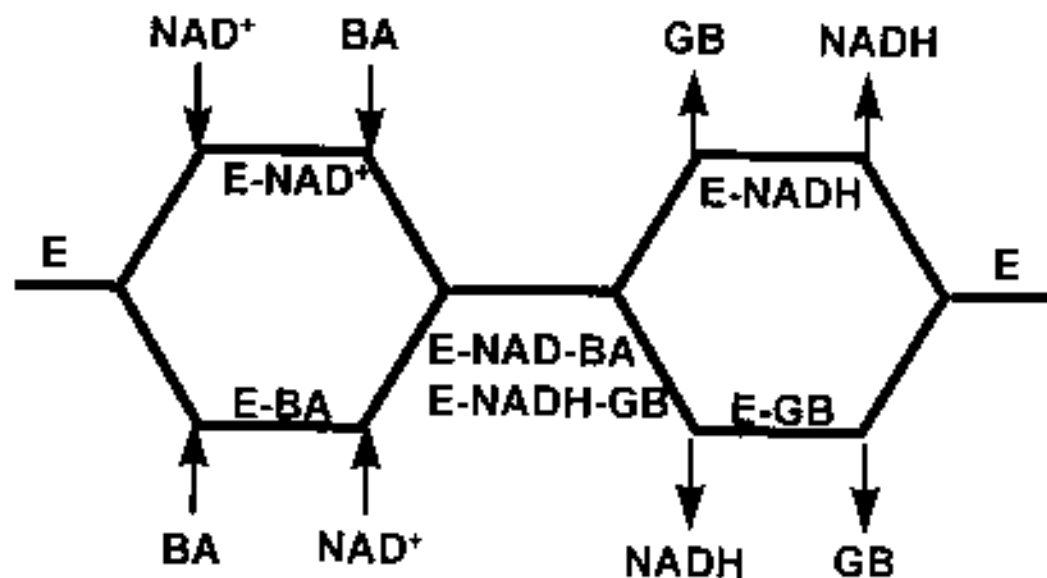


Figura 15. Mecanismo al azar en equilibrio rápido propuesto para la BADH de riñón de puerco.

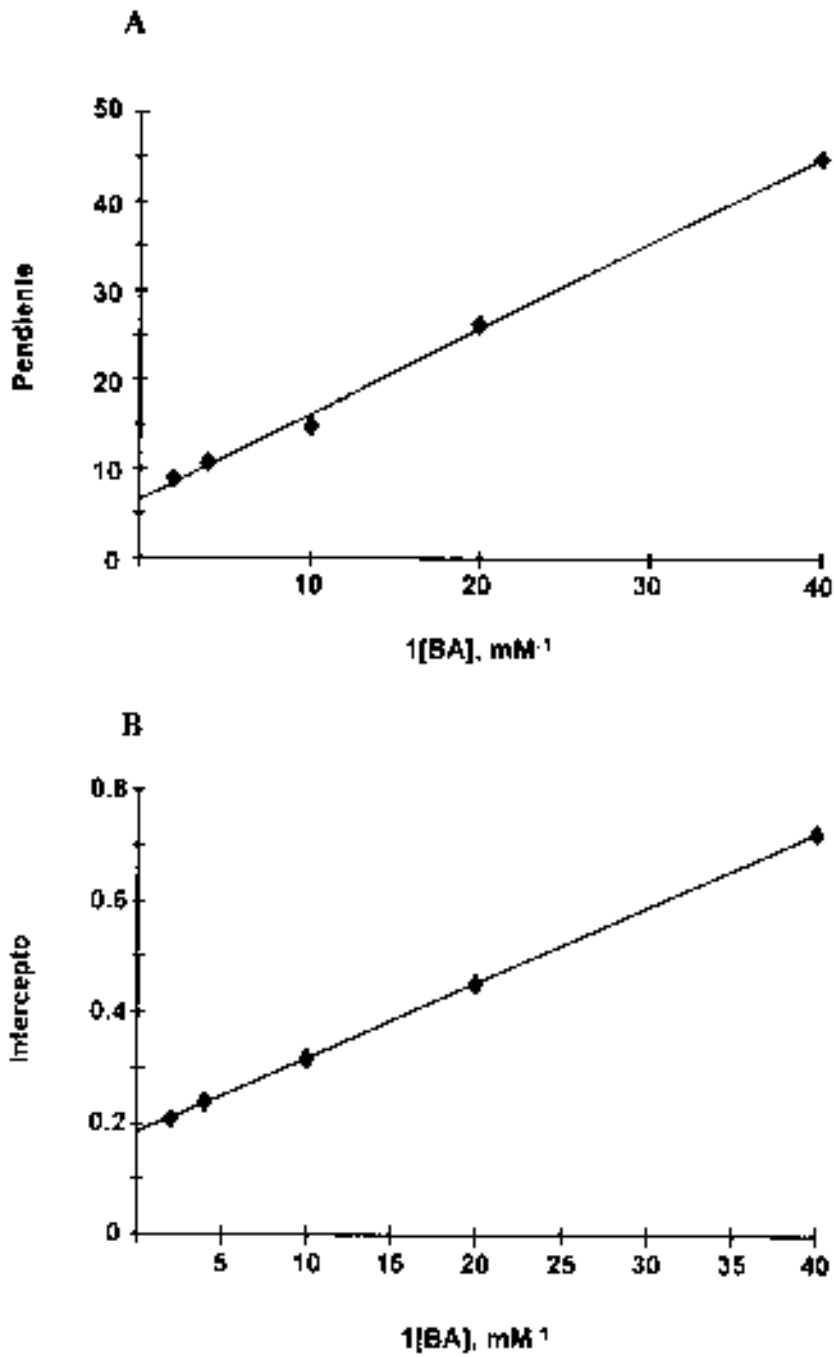


Figura 16. Regráficos de las pendientes (A) e interceptos (B) de las gráficas de dobles recíprocos de  $v$  vs  $[BA]$

y 17) fueron siempre lineales y a partir de ellos se calcularon las constantes cinéticas (Tabla 2).

El mecanismo cinético de la enzima de riñón difiere del mecanismo encontrado para las BADH's de *P. aeruginosa* y *E. coli* (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strom, 1990), en las cuales se propone un mecanismo Ping Pong. Sin embargo, la BADH de riñón, al igual que la BADH de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y otras ALDH's de hígado de mamíferos (Dickinson, 1989) sigue un mecanismo secuencial, aunque en estas dos últimas es ordenado. Sólomente se ha reportado que una ALDH de hígado de caballo (Feldman y Werner, 1972) muestra un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido, tal como el encontrado en este estudio.

El hecho de que la  $K_{m(NAD^+)}$  de la enzima de riñón sea menor que la  $K_{m(BA)}$ , indica que el primer sustrato que se une a la enzima es el  $NAD^+$ , tal como se ha reportado para la enzima de amaranto y ALDH's de hígado de mamíferos (Dickinson, 1982). Los valores de  $K_m$  para BA y  $NAD^+$  de algunos microorganismos (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992) y de hígado humano (Chern y Pietruszko, 1995) son más altos que los encontrados en este estudio, aunque todos en el orden micromolar. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las condiciones de temperatura, pH y concentración de la enzima fue distinta en todos los casos. En cuanto a la  $V_{max}$  encontrada, ésta fue superior a la de amaranto y espinaca (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Weretilnyk y Hanson, 1989) y muy similar a la de hígado humano (Chern y Pietruszko, 1995).

La enzima de riñón, a través de la metodología propuesta en este estudio, mostró tener un mecanismo al azar en equilibrio rápido, donde  $NAD^+$  es el sustrato que se une primero a la enzima. Sin embargo, es necesario confirmar estos

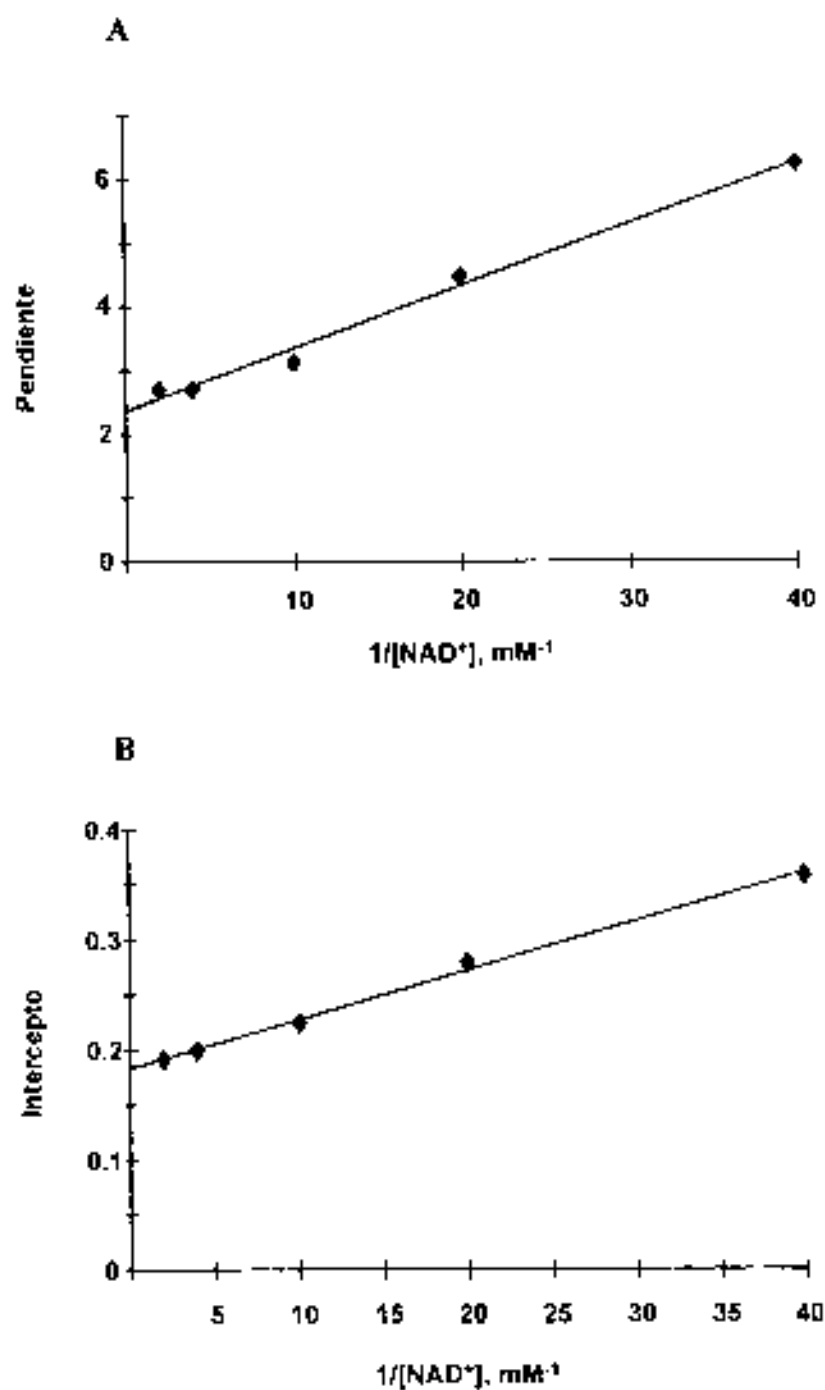


Figura 17. Regráficos de las pendientes (A) e interceptos (B) de las gráficas de dobles recíprocos de  $v$  vs  $[NAD^+]$ .

Tabla 2. Constantes Cinéticas de la BADH de Riñón de Puerco.

Constante	Valor
$K_{m(NAD)}$	$40.2 \pm 0.005 \mu\text{M}$
$K_{m(BA)}$	$127.3 \pm 0.014 \mu\text{M}$
$V_{max}$	$5.5 \pm 0.057 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg proteína}$



resultados en estudios posteriores, comparando los diferentes parámetros cinéticos con dos o más sustratos aldehídos, aprovechando que la enzima presenta actividad con algunos de ellos. También sería posible calcular primero las constantes de disociación para NAD<sup>+</sup> y el aldehído para determinar si el sustrato pudiera proteger a la enzima contra la desnaturalización por calor

## CONCLUSIONES

La BADH de riñón de puerco se purificó a homogeneidad electroforética aparente utilizando solo cuatro etapas cromatográficas, lo cual representa una metodología más simple que las reportadas para otras BADH's y ALDH's. Con ello, se logró alcanzar una actividad total de 3.02 U y una actividad específica de 6.9 U/mg proteína, lo cual representó un rendimiento del 11% y un factor de purificación de 329.

Mediante HPLC, la enzima de riñón muestra una masa molecular de 677 kDa, y mediante PAGE nativo, una masa molecular de 688 kDa. Cada subunidad de la enzima tiene una masa molecular de 52 kDa.

La enzima tiene un pH óptimo de 9.5 en buffer de glicina, permaneciendo estable en un rango de pH de 5.5 a 10.0.

Con los sustratos aldehído, la enzima es altamente específica para BA, pudiendo también reaccionar con butiraldehído, gliceraldehído y acetaldehído. Sin embargo, es específica solo para NAD<sup>+</sup>. La reacción de la BADH de riñón no cataliza la reacción reversible, es decir, no puede utilizar Betaína y NADH como sustratos.

En general, la enzima es estable a las altas concentraciones de sales, teniendo un efecto menos inhibitorio sobre la actividad las sales monovalente. Por lo tanto, esto constituye una propiedad esencial para cualquier enzima que participa en la síntesis celular de osmoprotectantes. Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas en este estudio no se observó un efecto activador real de las sales sobre la enzima.

La enzima también fue estable a las altas concentraciones de solutos orgánicos compatibles y no se encontró un efecto activador de estos compuestos sobre la enzima. La betaina ejerce un efecto de inhibición por producto.

Los datos de cinética enzimática indican que la BADH de riñón de puerco tiene un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido, y que posee una mayor afinidad por  $\text{NAD}^+$  que por BA. La  $K_m$  para  $\text{NAD}^+$  y BA es de 40.2 y 127.3  $\mu\text{M}$ , respectivamente, y la  $V_{\text{max}}$  es de 5.5  $\mu\text{moles de NADH formado/min/mg proteína}$

## BIBLIOGRAFIA

- Abe, T., Takada, K., Okhawa, K. y M. Matsuda.** (1990). Purification and Characterization of a Rat Brain Aldehyde Dehydrogenase Able to Metabolize  $\gamma$ -aminobutyraldehyde to  $\gamma$ -aminobutyric Acid. *Biochem. J.* 269:25-29
- Ahmad, N., Wyn Jones, R.G. y W.D. Jeschke.** (1987). Effect of Exogenous Glycinebetaine on  $\text{Na}^+$  Transport in Barley Roots. *J. Experimental Botany.* 38 (191):913-921
- Ambroziak, W. y R. Pietruszko.**(1991). Human Aldehyde Dehydrogenase. Activity with Aldehyde Metabolites of Monoamines, Diamines, and Polyamines. *J. Biol. Chem.* 266:13011-13018
- Anbari, K. y R.M. Schultz.** (1993). Effect of Sodium and Betaine in Culture Media on Development and Relative Rates of Protein Synthesis in Preimplantation Mouse Embryos In Vitro. *Molecular Reproduction and Development* 35:24-28
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. y T. Akazawa.** (1987). Purification of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Spinach Leaves and Preparation of its Antibody. *J. Biochem.* 101:1485-1488
- Arakawa, K., Katayama, M. y T. Takabe.** (1990). Levels of Betaine and Betaine Aldehyde Dehydrogenase Activity in the Green Leaves, and Etiolated Leaves and Roots of Barley. *Plant Cell Physiol.* 31:797-803
- Bagnasco, S., Balaban, R., Fales, H.M., Yang, Y. y M. Burg.** (1986). Predominant Osmotically Active Organic Solutes in Rat and Rabbit Renal Medullas. *J. Biol. Chem.* 261(13):5872-5877
- Beck, F., Dörge, A., Rick, R. y K. Thurau.** (1984). Intra and Extracellular Element Concentrations of Rat Renal Papilla in Antidiuresis. *Kidney Int.* 25:397-403
- Beck, F., Dorge, A., Rick, R. y K. Thurau** (1985). Osmoregulation of Renal Papillary Cells. *Pfluegers Arch* 405(1):S28-S35

- Beck, F.X., Dörge, A. y K. Thurau. (1988a).** Cellular Osmoregulation in Renal Medulla. *Renal Physiol. Biochem.* 3-5:174-186
- Beck, F.X., Dörge, A. y K. Thurau. (1988b).** Cellular Osmoregulation in the Renal Papilla. *Klin. Wschr.* 66:843-848
- Beck, F.X., Schmolke, M., Guder, W.G., Dörge, A. y K. Thurau (1992)** Osmolytes in Renal Medulla During Rapid Changes in Papillary Tonicity. *Am J. Physiol.* 262:F849-F856
- Berkow, R. y J.H. Talbott (Eds.). (1978).** El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. Merck Sharp & Dohme Research Laboratories División de Merck & Co., Inc. Rahway, N.J. E.U.A. pp. 711-814
- Boyd, L.A., Adam, L., Pelcher, L.E., McHughen, A., Hirji, R. y G. Selvaraj. (1991).** Characterization of an *Escherichia coli* Gene Encoding Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) Structural Similarity to mammalian ALDHs and a Plant BADH. *Gene.* 103:45-52
- Bradford, M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Braun, E.J. (1985).** Comparative Aspects of the Urinary Concentrating Process. *Renal Physiol. Basel.* 8:249-260
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F. y A.D. Hanson. (1989).** Evidence for a Ferredoxin-dependent Choline Monooxygenase from Spinach Chloroplast Stroma. *Plant Physiol.* 90:322-329
- Brown, A.D. (1976).** Microbial Water Stress. *Bacteriol. Rev.* 40:803-846
- Brown, A. y J. Simpson. (1972).** Water Relations of Sugar-tolerant Yeasts: the Role of Intracellular Polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72:589-591
- Cairney, J., Booth, I.R. y C.F. Higgins. (1985a).** *Salmonella typhimurium* pro P Gene Encodes a Transport System for the Osmoprotectant Betaine. *J. Bacteriol.* 164:1218-1223

- Cairney, J., Booth, I.R. y C.F. Higgins. (1985b). Osmoregulation of Gene Expression in *Salmonella typhimurium*: pro U Encodes an Osmotically-induced Betaine Transport System. *J. Bacteriol.* 164:1224-1232
- Chern, M.K. y R. Pietruszko. (1995). Human Aldehyde Dehydrogenase E3 Isozyme is a Betaine Aldehyde Dhydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213(2):561-568
- Chi-Shui, L. y W. Ru-Dan. (1986). Choline Oxidation and Choline Dehydrogenase. *J. Protein Chem.* 5(3):193-200
- Choquet, C.G., Ahonkhai, I., Klein, M. y D.J. Kushner. (1991). Formation and Role of Glycine Betaine in the Moderate Halophile *Vibrio costicola*. *Arch Microbiol.* 155:153-158
- Cleland, W.W. (1963). The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products. I.- Nomenclature and Rate Equations. *Biochim. Biophys Acta.* 67:104-137
- Coughlan, S.J. y U. Heber. (1982). The Role of Glycinebetaine in the Protection of Thylakoids Against Freezing Stress. *Planta.* 154:6-17
- Creaser, E.H., Porter, R.L. y J.A. Pateman. (1987). Purification and Properties of Aldehyde Dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Int. J Biochem.* 19 (10):1009-1012
- Csonka, L.N. y A.D. Hanson. (1991). Prokaryotic Osmoregulation. *Genetics and Physiology. Annu. Rev. Microbiol.* 45:569-606
- Davies, S.E.C., Woolf, D.A. Chalmers, R.A., Rafter, J.E.M. y R.A. Iles. (1992). Proton NMR Studies of Betaine Excretion in the Human Neonate: Consequences for Choline and Methyl Group Supply. *J. Nutr. Biochem.* 3:523-530
- Dickinson, F.M. (1989). Aldehyde Dehydrogenase: Kinetics and Mechanism. *Biochem Soc. Trans.* 17:299-300
- Dragolovich, J. y S.K. Pierce. (1994). Characterization of Partially Purified Betaine Aldehyde Dehydrogenase From Horseshoe Crab (*Limulus polyphemus*) Cardiac Mitochondria *The Journal of Experimental Zoology.* 270:417-425

- Du Vigneaud, V., Simmonds, S. Chandler, J.P. y M. Cohn. (1946).** A Further Investigation of the Role of Betaine in Transmethylation Reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* :639-648
- Falkenberg, P. y A.R. Strom. (1990).** Purification and Characterization of Osmoregulatory Betaine Aldehyde Dehydrogenase of *Escherichia coli* *Biochim. Biophys. Acta.* 1034:253-259
- Feldman, R.I. y H. Weiner. (1972).** Horse Liver Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem* 247:267-272
- Galinski, E. y H.G. Trüper. (1982).** Betaine, a Compatible Solute in the Extremely Halophilic Phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris* FEMS *Microbiol. Lett.* 13:357-360
- Gamboa, A., Valenzuela, E.M., y E. Murillo. (1991).** Biochemical Changes due to Water Loss in Leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J. Plant Physiol* 137:586-590
- Garcia-Perez, A. y M.B. Burg. (1991a).** Renal Medullary Organic Osmolytes *Physiol. Rev.* 71:1081-1115
- Garcia-Perez, A. y M.B. Burg. (1991b).** Role of Organic Osmolytes in Adaptation of Renal Cells to High Osmolality. *J. Membrane Biol.* 119:1-13
- Gilles, R. (1978).** Intracellular Free Amino Acids and Cell Volume Regulation During Osmotic Stresses. En: *Osmotic and Volume Regulation* (Eds. C.B. Jørgensen y F. Skadhauge). Academic Press, N. York. pp. 470-486
- Goldberg, A.M. y R.E. Mc Caman. (1968).** Betaine Aldehyde Dehydrogenase: Assay and Partial Purification from Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 167:186-189
- Grossman, E.B. y S.C. Hebert. (1989)** Renal Inner Medullary Choline Dehydrogenase, Activity: Characterization and Modulation *Am. J. Physiol* 256:F107-F112
- Grunewald, R.W. y A. Eckstein. (1995).** Osmotic Regulation of the Betaine Metabolism in Immortalized Renal Cells. *Kidney Int.* 48:1714-1720

- Guder, W.G., Beck, F.X. y M. Schmolke (1990). Regulation and Localization of Organic Osmolytes in Mammalian Kidney. *Klin. Wschr.* 68:1091-1095
- Gullans, S.R., Blumenfeld, J.D., Balschi, J.A., Kaleta, M., Brenner, R.M., Heilig, C.W. y S.C. Hebert (1988). Accumulation of Major Organic Osmolytes in Rat Renal Inner Medulla in Dehydration. *Am. J. Physiol.* 255:F626-F634
- Guyton, A.C. (1981). *Medical Physiology*. Sexta Edición W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Hanson, A.D. y W.A. Hitz. (1982). Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:163-203
- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Chamberlin, B. y D.A. Gage (1991). Comparative Physiological Evidence that  $\beta$ -alanine Betaine and Choline-O-sulfate Act as Compatible Osmolytes in Halophytic *Limonium* Species. *Plant Physiol.* 97:1119-1205
- Handler, J.S. y H.M. Kwon. (1993). Regulation of Renal Cell Organic Osmolyte Transport by Tonicity. *Am. J. Physiol.* 265:C1449-C1455
- Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L. y I.R. Booth. (1987) Osmotic Regulation of Gene Expression: Ionic Strength as an Intracellular Signal? *TIBS.* 12:339-344
- Hochacka, P.W. y G.N. Somero. (1984) *Biochemical Adaptation*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey
- Horton, A.A. y C. Barrett. (1975) The Subcellular Localization of Aldehyde Dhydrogenase in Rat Liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 167 426-436
- Jolivet, Y., Hamelin, J. y F. Larher. (1983). Osmoregulation in Halophytic Higher Plants The Protective Effect of Glycinebetaine and Other Related solutes Against Oxalate destabilization of Membranes in Beet Root Cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 109:171-180
- Koivula, T. y M. Koivusalo. (1975). Different Forms of Rat Liver Aldehyde Dhydrogenase and their Subcellular Distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* 397:9-23



- Kurya, G., Ambroziak, W. y R. Pietruszko.** (1989). Human Aldehyde Dehydrogenase. Purification and Characterization of a Third Isozyme with Low  $K_m$  for  $\alpha$ -aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* 264 (8):4715-4721
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685
- Leatherbarrow, R.J.** (1987). *Enzfitter*, Elsevier Biosoft.
- Lehninger, A.L.** (1982). *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. N. York, N. York
- Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T., y R.C. Valentine.** (1984). Molecular Biology of Osmoregulation. *Science.* 224:1064-1068
- Lien, Y.H., Pacelli, M.M. y E.J. Braun.** (1993). Characterization of Organic Osmolytes in Avian Renal Medulla: a Nonurea Osmotic Gradient System. *Am. J. Physiol.* 264: R1045-R1049
- Lindahl, R. y S. Evces.** (1984). Rat Liver Aldehyde Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3): I. Isolation and Characterization of 4 High Michaelis Constant Normal Liver Isozymes. *J. Biol. Chem.* 259:11986-11990
- Manetas, Y., Petropoulou, Y. y G. Karabourniotis.** (1986). Compatible Solutes and Their Effects on Phosphoenolpyruvate Carboxylase of  $C_4$ -Halophytes. *Plant Cell Environ.* 9:145-151
- McCue, K.F. y A.D. Hanson.** (1990). Drought and Salt Tolerance: Towards Understanding and Application. *Trends Biotechnol.* 8:358-362
- Measures, J.C.** (1975). Role of Amino Acids in Osmoregulation of Nonhalophilic Bacteria *Nature.* 257:398-400
- Meury, J.** (1988). Glycinebetaine Reverse the Effects of Osmotic Stress on DNA Replication and Cellular Division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 149:232-239
- Möckel, G., Dasser, H.G., Chen, T.J. y W.G. Guder.** (1993). Betaine Synthesis and Uptake in Rat Kidney Tubules. (Abstract) *Pflugers Arch.* 422(1):R93

- Moore, D.J., Reed, R.H. y W.D.P. Stewart. (1987). A Glycine Betaine Transport System in *Aphanathece halophytica* and Other Glycine Betaine-Synthesizing Cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 147:399-405
- Muri, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y. y H. Yamada. (1980) Characterization of Betaine Aldehyde Dchydrogenase from *Cylindrocarpum didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* 44:3015-3016
- Mori, N., Yoshida, N. y Y. Kitamoto. (1992). Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Fermit Bioeng.* 73:352-356
- Muntz, J.A. (1949). The Inability of Choline to Transfer a Methyl Group Directly to Homocysteine for Methionine Formation. *J. Biol. Chem.*: 489-499
- Nagasawa T., Kabawata, Y., Tani, Y. y H. Yamada. (1976). Purification and Characterization of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr. Biol. Chem.* 40:1743-1749
- Nakanishi, T., Uyama, O., Nakahama H., Takamitsu, Y. y M. Sugita. (1993). Determinants of Relative Amounts of Medullary Organic Osmolytes: Effects of NaCl and Urea Differ. *Am. J. Physiol.* 264:F472-F479
- Nicolaus, B. Lanzotti, V., Trincone, A., De Rosa, M., y A. Gambacorta (1989). Glycine Betaine and Polar Lipid Composition in Halophilic Archaeobacteria in Response to Growth in Different Salt Concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.* 59:157-160
- Paleg, L.G., Douglas, T.J., van Daal, A. y D.B. Keech (1981) Proline, Betaine and Other Organic Solutes Protect Enzymes Against Heat Inactivation. *Aust J. Plant Physiol.* 8:107-114
- Pan, S.M. (1988). Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Spinach *Bot. Bull. Academia Sinica.* 29:255-263
- Perroud, B. y D. Le Rudulier. (1985). Glycine Betaine Transport in *Escherichia coli* Osmotic Modulation. *J. Bacteriol.* 161:383-401

- Puljakoff-Mayber, A., Symon, D.E., Jones, G.P., Naidu, B.P. y L.G. Paleg.** (1987). Nitrogenous Compatible Solutes in Native South Australian Plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 14:341-350
- Putts, W.T.W. y G. Parry.** (1963). *Osmotic and Ionic Regulation in Animals.* Pergamon Press, N. York. pp 44-88
- Rhodes, D.** (1987). Metabolic Responses to Stress. *Biochem Plants.* 12:201-241
- Rhodes, D. y A.D. Hanson.** (1993). Quaternary ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 44:357-384
- Robinson, S.P. y G.P. Jones.** (1986). Accumulation of Glycinebetaine in Chloroplasts Provides Osmotic Adjustment During Salt Stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:659-668
- Rothschild, H.A. y E.S. Guzman Barron.** (1954). The Oxidation of Betaine Aldehyde by Betaine Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 209:511-523
- Rudolph, A.S., Crow, J.H. y L.M. Crowe** (1986). Effects of Three Stabilizing Agents-Proline, Betaine, and Trehalose- on Membrane Phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 245:134-143
- Schmidt-Nielsen, K.** (1981). *Fisiología Animal. Primera Edición en Español.* Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana, S.A. de C.V. México
- Schmolke, M., Bornemann, A. y W.G. Guder.** (1991). Distribution and Regulation of Organic Osmolytes Along the Nephron. En: *Cellular and Molecular Biology of the Kidney* (Eds. Koide H. Endou y H. Kurokawa). Karger, Basel pp 255-263
- Schröppel-Meier, G. y M.M. Kaiser.** (1988). Ion Homeostasis in Chloroplasts Under Salinity and Mineral deficiency. *Plant Physiol.* 87:822-827
- Schwab, K.B. y E. Heber** (1984). *Planta.* 161:37-45
- Segel, I.H.** (1975) Kinetics of unireactant enzymes. En: *Enzyme Kinetics*, John Wiley and Sons, N. York pp 18-89

- Somero, G.** (1986). Protons, Osmolytes, and Fitness of Internal Milieu for Protein Function. *Am J. Physiol.* 251:R197-R213
- Stepunkus, P.I.** (1984). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:543-584
- Strand, F.L.** (1983). *Physiology: A Regulatory Systems Approach* Segunda Edición. Macmillan Publishing Co. Inc. N. York. pp 327
- Strom, A.R., Falkenberg, P. y B. Landfald** (1986). Genetics of Osmoregulation in *Escherichia coli*: Uptake and Biosynthesis of Organic Osmolytes. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:79-86
- Valenzuela-Soto, E.M. y R.A. Muñoz-Clares.** (1993). Betaine-aldehyde Dehydrogenase from Leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. Exhibits an Iso Ordered Bi Bi Steady State Mechanism. *J. Biol. Chem.* 268:32
- Valenzuela-Soto, E.M. y R.A. Muñoz-Clares.** (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
- Von-Hippel, P. y T. Schleich.** (1969). The Effects of Neutral Salts on the Structure and Conformational Stability of Macromolecules in Solution. En: *Structure and Stability of Biological Macromolecules* (Eds. S.N. Timasheff y G.D. Fasman). Dekker, N. York. pp. 417-569
- Weigel, P., Weretilnyk, E.A. y A.D. Hanson.** (1986). Betaine Aldehyde Oxidation by Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol.* 82:753-759
- Weretilnyk, E.A., Bednarek, S., McCue, K.F., Rhodes, D. y A.D. Hanson.** (1989). Comparative Biochemical and Immunological Studies of the Glycine Betaine Synthesis Pathway in Diverse Families of Dicotyledons. *Planta.* 178:343-352
- Weretilnyk, E.A. y A.D. Hanson.** (1989). Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Spinach Leaves: Purification, *in vitro* Translation of the mRNA, and Regulation by Salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 271:56-63
- Weretilnyk, E.A. y A.D. Hanson.** (1990). Molecular Cloning of a Plant Betaine Aldehyde Dehydrogenase, an Enzyme Implicated in Adaptation to Salinity and Drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:2745-2749

- Wirthensohn, G. y W.G. Guder.** (1982). Studies on Renal Choline Metabolism and Phosphatidylcholine Synthesis. En: *Biochemistry of Kidney Functions* (Eds F. Morel). Elsevier, Amsterdam. pp 119-128
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. y R. Hancock.** (1981). Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 118:197-203
- Wyn Jones, R.G., Storey, R., Leigh, R.A., Ahmad, N. y A. Pollard.** (1977). A Hypothesis on Cytoplasmic Osmoregulation. En: *Regulation of Cell Membrane Activities in Higher Plants* (Eds. Marre, O Ciferri). Elsevier/North Holland, Amsterdam. pp 121-136
- Wyn Jones, R.G. y R. Storey.** (1981). Betaines. En: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (Eds. Paleg, L.G. y D. Aspinall). Academic Press, Sydney. pp 171-204
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. y G.M. Somero.** (1982). Living With Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science.* 217:1214-1222
- Yancey, P.H.** (1985) Organic Osmotic Effectors in Cartilaginous fishes. En: *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation* (Eds. R. Gilles y M. Gilles-Bailien) Springer-Verlag, Berlin. pp 424-436
- Yancey, P.H. y M.B. Burg.** (1989). Distribution of Major Organic Osmolytes in Rabbit Kidneys in Diuresis and Antidiuresis. *Am. J. Physiol.* 257:F602-F607
- Yancey, P.H. y M.B. Burg.** (1990). Counteracting Effects of Urea and Betaine in Mammalian Cells in Culture. *Am. J. Physiol.* 258:R198-R204
- Yancey, P.H.** (1994). Compatible and Counteracting Solutes. En: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (Ed. K. Strange). CRC Press. Boca Raton, Fl. pp. 81-109