



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
EFFECTO DEL ALDRITOL SOBRE LAS PROPIEDADES
CINÉTICAS DE LA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA
HUMANA CLASE 1
TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Jorge Raymundo Rodríguez

DIRECTOR DE TESIS

Belem Yoal Sánchez



CD. MX.

AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**
VOCAL: **Profesor: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ**
SECRETARIO: **Profesora: BELEM YOVAL SÁNCHEZ**
1er. SUPLENTE: **Profesora: BEATRIZ RUÍZ VILLAFAN**
2° SUPLENTE: **Profesora: NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”.**

**FINANCIAMIENTO OTORGADO POR CONACYT PROYECTO No.: 257943
CON EL NOMBRE MITIGACIÓN DE PROCESOS NEURODEGENERATIVOS A
TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE ALDEHÍDO
DESHIDROGENASAS (ALDHs).**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. BELEM YOVAL SÁNCHEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. JOSÉ SALUD RODRÍGUEZ ZAVALA

SUSTENTANTE:

JORGE RAYMUNDO RODRÍGUEZ

Índice.

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
2.1. Generalidades de las enzimas.	2
2.2. Cinética enzimática.	3
2.2.1. Efecto del pH.	5
2.2.2. Efecto de la temperatura.	6
2.2.3. Moduladores enzimáticos.	7
2.2.3.1. Inhibidores enzimáticos.	7
2.2.3.2. Activadores enzimáticos.	9
2.3. Generalidades de los aldehídos.	10
2.4. Generalidades de las ALDHs.	12
2.5. Estructura de las ALDHs.	15
2.6. Mecanismo general de reacción de las ALDHs.	15
2.7. Moduladores de la actividad de las ALDHs.	17
3. Antecedentes.	21
4. Hipótesis.	23
5. Objetivo general.	23
6. Objetivos particulares.	23
7. Materiales y métodos.	24
7.1. Materiales.	24
7.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.	24
7.3. Cuantificación de proteínas.	25

7.4. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida y determinación de pureza de la ALDH1A1.	26
7.5. Análisis cinético.	26
7.5.1. Actividad de ALDH.	26
7.5.2. Evaluación del efecto protector del aldritol sobre la actividad de la ALDH1A1 en presencia de inhibidores.	27
7.5.3. Efecto de la temperatura.	27
7.5.4. Interacción enzima-aldritol.	27
7.6. Evaluación de la protección por aldritol en un modelo de estrés oxidante.	28
7.7. Efecto del complejo glutatión-aldritol.	28
7.8. Efecto del aldritol sobre la actividad de la alcohol deshidrogenasa.	28
8. Resultados.	29
8.1. Sobreexpresión y purificación de la aldehído deshidrogenasa humana clase 1.	29
8.2. Análisis cinético.	30
8.2.1. Determinación de $K_{0.5}$ por aldritol.	30
8.2.2. Determinación de los valores de K_m y V_{max} en presencia de aldritol.	31
8.2.3. Aldehídos producto de la lipoperoxidación.	33
8.2.4. Interacción entre el aldritol y ALDH1A1.	36
8.2.4.1. Evaluación del efecto protector del aldritol sobre la actividad de la ALDH1A1 en presencia de inhibidores.	36
8.2.4.2. Efecto de la temperatura.	36
8.2.4.3. Efecto de la dilución.	38

8.2.5. Evaluación de la protección por aldritol en un modelo de estrés oxidante.	40
8.2.6. Interacción glutatión-aldritol y su efecto sobre la actividad de ALDH1A1.	41
8.2.7. Efecto del aldritol sobre la actividad de otras isoformas de aldehído deshidrogenasa.	41
9. Análisis y discusión de resultados.	44
10. Conclusiones.	48
11. Perspectivas.	49
12. Referencias bibliográficas.	50
13. Anexo.	56

Abreviaturas

ALDH	aldehído deshidrogenasa
ALDH1A1	aldehído deshidrogenasa clase 1A1
ALDH2	aldehído deshidrogenasa clase 2
ALDH3A1	aldehído deshidrogenasa clase 3A1
ALDH4	aldehído deshidrogenasa clase 4
ALDH5	aldehído deshidrogenasa humana clase 5
ALDH7	aldehído deshidrogenasa humana clase 7
ADH	alcohol deshidrogenasa
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
4-HHE	4-hidroxi-2-hexenal
ERO	especies reactivas de oxígeno
[S]	concentración de sustrato
[E]	concentración de enzima
[ES]	concentración del complejo enzima-sustrato
[EAS]	concentración del complejo enzima-activador-sustrato
DOPAL	dihidroxifenilacetaldehído
DSF	disulfiram
DDC	dietilditiocarbamato
FDA	Food and Drug Administration
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
SDS	dodecilsulfato sódico
BCA	ácido bicinconínico
DSF	disulfiram
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

1. Resumen.

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación (deshidrogenación) de aldehídos a su respectivo ácido carboxílico. A la fecha, se han identificado 19 genes de ALDHs en el genoma humano. Estas enzimas participan en una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo la desintoxicación de aldehídos generados exógena y endógenamente. La acumulación de dichos aldehídos genera daño mitocondrial, peroxidación lipídica y altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO), tal como ocurre en procesos neurodegenerativos y en diferentes enfermedades como el síndrome de Sjögren-Larsson, la hiperprolinemia de tipo II y la aciduria γ -hidroxibutírica.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la 2-2'-ditiopiridina (aldritiol), sobre las propiedades cinéticas de la aldehído deshidrogenasa clase 1 humana (ALDH1A1). Se determinó que este compuesto es un activador no esencial de tipo mixto para ALDH1A1, que se une fuertemente al sitio de unión del aldehído dentro del "sitio" catalítico. Dicho compuesto, incrementa la eficiencia catalítica de esta enzima por aldehídos producto de la lipoperoxidación tales como acroleína, 4-hidroxi-2-hexenal y 4-hidroxi-2-nonenal. Por otro lado, al evaluar el efecto del aldritiol en otras isoformas de ALDH (2, 3 y 5) se observó un incremento en la actividad de estas, siendo la única diferencia la concentración de aldritiol requerida para alcanzar la máxima activación. Al observar que este compuesto es capaz de activar a las isoformas de las ALDHs humanas, se evaluó su efecto sobre la actividad de otras enzimas no relacionadas a las ALDHs, como la alcohol deshidrogenasa. A este respecto, no se observaron cambios en su actividad en presencia y ausencia del aldritiol, lo cual sugiere que el efecto de activación es específico en las diferentes ALDHs a las concentraciones utilizadas (se requiere ensayar otras enzimas no relacionadas a las ALDHs). Por lo anterior, es importante profundizar en la caracterización del efecto de este compuesto sobre las propiedades cinéticas de las ALDHs; ya que la posibilidad de modular la actividad de estas enzimas, nos permitirá en un futuro proponer nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a disminuir la acumulación de aldehídos lipídicos y con ello a la mitigación del estrés oxidante, preservando la integridad celular en diversos padecimientos.

2. Introducción.

2.1. Generalidades de las enzimas.

Las enzimas son proteínas que funcionan como catalizadores biológicos en los organismos vivos, disminuyendo la energía de activación de una reacción para favorecer la generación de los productos. Los catalizadores logran disminuir esta energía al unir los reactivos (sustratos) dentro de su sitio catalítico o sitio activo, con el fin de facilitar la ruptura y formación de enlaces (puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas) que dan origen al producto de la reacción (Figura 1).

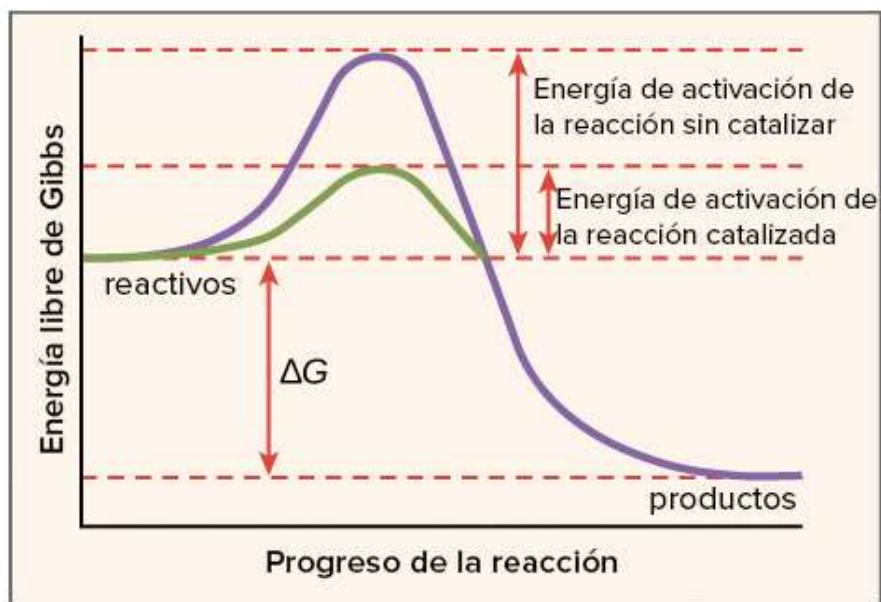


Figura 1. Energía involucrada en una reacción. En la gráfica se muestra la diferencia de la energía requerida para llevar a cabo una reacción en presencia (-) y ausencia (-) de un catalizador.

En una enzima, el sitio activo está formado por diferentes aminoácidos que poseen cadenas laterales pequeñas o grandes, ácidas o básicas, hidrofílicas o hidrofóbicas, lo cual, le proporciona especificidad y capacidad catalítica. Las enzimas son catalizadores extraordinarios, pues pueden incrementar la velocidad de una reacción de 5 a 17 órdenes de magnitud y además son altamente específicas, logrando discernir entre sustratos con estructuras similares (Nelson, Cox, 2015). Esto se debe al reordenamiento de enlaces covalentes entre sustratos y grupos

funcionales de la enzima, formando enlaces covalentes transitorios, activando al sustrato o transfiriendo transitoriamente un grupo funcional del sustrato a la enzima durante la reacción, por lo general estos cambios ocurren en el sitio activo. Los cambios conformacionales que sufre la enzima en este proceso, así como la nueva orientación que adoptan los sustratos, se denomina ajuste inducido, en donde también intervienen enlaces débiles como puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas que pueden afectar la estructura de toda la enzima.

2.2. Cinética enzimática.

La cinética enzimática se encarga del estudio de las reacciones químicas en las que intervienen enzimas como catalizadores, nos permite conocer mejor el mecanismo mediante el cual interaccionan las enzimas con sus sustratos en una reacción y cómo se puede afectar su actividad en presencia de un modulador, ya sea inhibiendo o potenciando dicha actividad.

Las reacciones enzimáticas están regidas por los mismos principios generales de las reacciones que no son catalizadas, es decir, las enzimas no afectan la relación sustrato-producto o el equilibrio de la reacción, lo único que afectan es la velocidad de la reacción. A concentración baja de sustrato, la velocidad inicial (v_0) de la reacción es casi proporcional a la concentración del sustrato y la reacción es aproximadamente de primer orden, pero a medida que la concentración del sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye y deja de ser proporcional a la concentración del sustrato, en estas condiciones el orden de la reacción es mixto. Al aumentar la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción se vuelve independiente de dicha concentración y se aproxima de una manera asintótica a un valor constante, en este intervalo de concentración de sustrato la reacción es de orden cero con respecto al sustrato y por esto es que se le conoce como el punto de saturación.

Nota: La velocidad inicial (v_0) de una reacción es en la que existe una relación lineal entre [S] y la velocidad de generación del producto, en una condición donde el consumo de [S] no es mayor al 5%.

La unión del sustrato [S] a la enzima [E] ocurre de forma reversible, formando un complejo enzima-sustrato [ES]. Posteriormente, este complejo se disocia generando el producto y la enzima libre, lista para iniciar un nuevo ciclo catalítico. En este punto el paso limitante de la reacción es la descomposición del complejo [ES], para la formación del producto (Ecuación 1, cinética de Michaelis-Menten).



Ecuación 1. Cinética de Michaelis-Menten.

De lo anterior, deriva la ecuación de Michaelis-Menten, que define la ecuación de velocidad de una enzima para un solo sustrato. Dicha ecuación relaciona la velocidad inicial (v_0), la velocidad máxima (V_{max}) y la concentración inicial de sustrato [S], a través de la constante de Michaelis-Menten (K_m) (Ecuación 2).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 2. Ecuación de Michaelis-Menten.

El valor de K_m , representa la concentración de sustrato a la cual se alcanza un medio de la velocidad máxima, estos términos pueden obtenerse de la representación gráfica de esta ecuación (Figura 2) (Nelson, Cox, 2015).

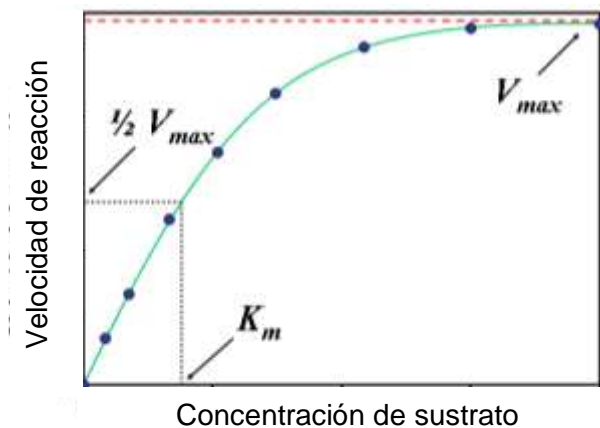


Figura 2. Gráfica de Michaelis-Menten.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar algebraicamente al realizar el doble recíproco de cada miembro de la ecuación 2.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación 3. Ecuación de Lineweaver-Burk.

La ecuación 3 se conoce como gráfico de Lineweaver-Burk y nos permite determinar con mayor precisión el valor de V_{max} , debido a que en la representación no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten el valor de V_{max} , solo es un aproximado, pues se considera una concentración de sustrato infinita (Figura 3) (Nelson, Cox, 2015).

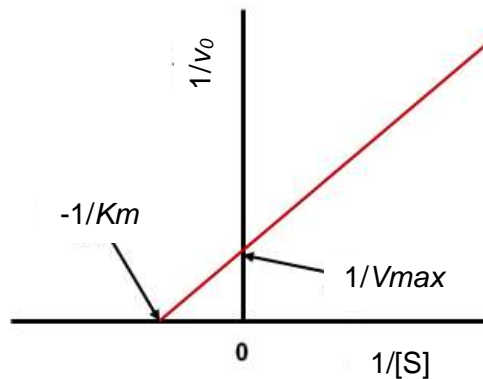


Figura 3. Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk.

Las reacciones enzimáticas se pueden ver afectadas por diversos factores, entre los que destacan la concentración de los sustratos, contenido de sales, cambios en el pH y temperatura (Copeland, 2000), tal como se describe a continuación.

2.2.1. Efecto del pH.

Cada enzima tiene un pH óptimo, que le confiere estabilidad estructural y catalítica, modificaciones en los valores de pH alteran el grado de ionización de los diferentes aminoácidos que conforman a las enzimas, alterando su estado conformacional y

con ello su actividad. A continuación se describen tres formas en las que el pH modifica la actividad de las enzimas:

1. pH extremo (< 4 y > 10), en estos intervalos de pH casi todos los residuos de los aminoácidos han cambiado su grado de ionización alterando la estructura tridimensional de la enzima, lo que puede llevar a la pérdida de actividad parcial o total, este cambio puede ser irreversible.
2. Los cambios de pH en un intervalo de 4 a 10 afectan con menor impacto a los grupos ionizables. Sin embargo, al modificar el grado de ionización de los residuos involucrados en el sitio activo, la actividad enzimática puede variar de manera significativa (Copeland, 2000).
3. Los cambios en el pH no solo afectan a la enzima, sino también al sustrato modificando la unión enzima-sustrato.

2.2.2. Efecto de la temperatura.

Al incrementar la temperatura de una reacción aumenta su velocidad, esto se debe a que las moléculas alcanzan más fácilmente la energía cinética necesaria para superar la energía de activación. Sin embargo, este incremento en la temperatura también afecta la estructura de la enzima, debido a que se rompen enlaces débiles como puentes de hidrógeno y enlaces iónicos, por lo que la actividad enzimática comienza a disminuir. Debido a estos dos fenómenos existe una temperatura óptima para cada reacción (Figura 4) (Copeland, 2000).

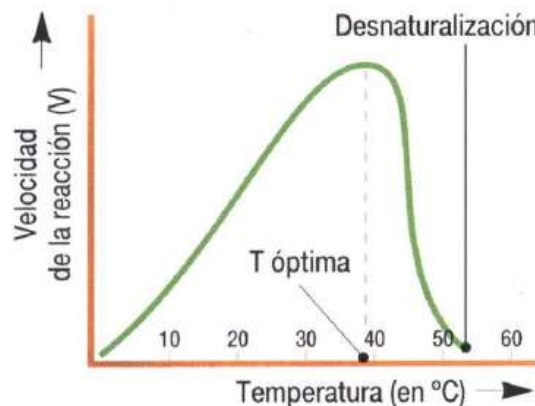


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

2.2.3. Moduladores enzimáticos.

Las enzimas pueden ser reguladas por una gran variedad de moléculas, entre las que se encuentran: inhibidores, los cuales bloquean la catálisis; activadores, que aumentan la catálisis y cofactores, que son necesarios para la actividad enzimática.

2.2.3.1. Inhibidores enzimáticos.

El estudio de los inhibidores enzimáticos ha permitido obtener una gran cantidad de información sobre el mecanismo de la catálisis enzimática, sobre la especificidad por los sustratos, la elucidación de la naturaleza de los grupos funcionales presentes en el sitio activo y cómo estos ayudan a la estabilización de las enzimas.

Al hablar de inhibidores se tiene que mencionar que estos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. Inhibidores reversibles: a este grupo pertenecen las moléculas que se unen a la enzima de forma no covalente. Existen tres tipos: a) competitivos, b) acompetitivos y c) mixtos.

a). Inhibidores competitivos: estas moléculas, compiten con el sustrato de la enzima por el sitio de unión y al ocupar este sitio impiden la formación del complejo [ES], afectando la catálisis; esto se debe a la semejanza estructural entre el inhibidor y el sustrato. Este tipo de inhibición afecta la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m), pero no la V_{max} y el efecto se puede contrarrestar al incrementar la concentración del sustrato para desplazar al inhibidor (Figura 5) (Nelson, Cox, 2015).

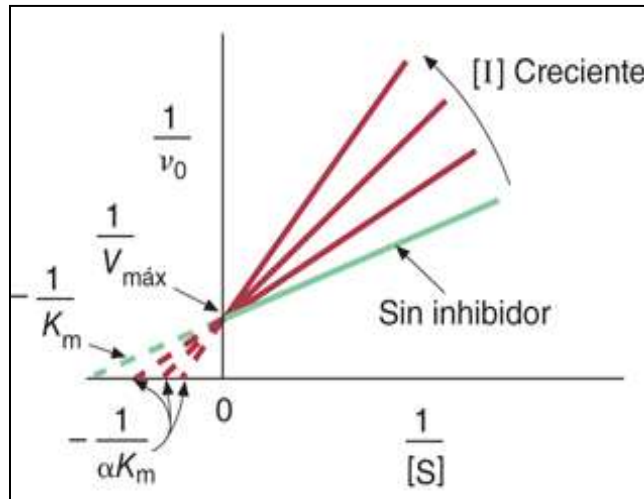


Figura 5. Representación gráfica de la inhibición competitiva (Mckee, 2014).

b). *Inhibidores acompetitivos*: las moléculas de este grupo solo se pueden unir al complejo [ES] formando el complejo [ESI]. En este tipo de inhibición disminuye tanto la velocidad máxima, como el valor de K_m aparente (Figura 6).

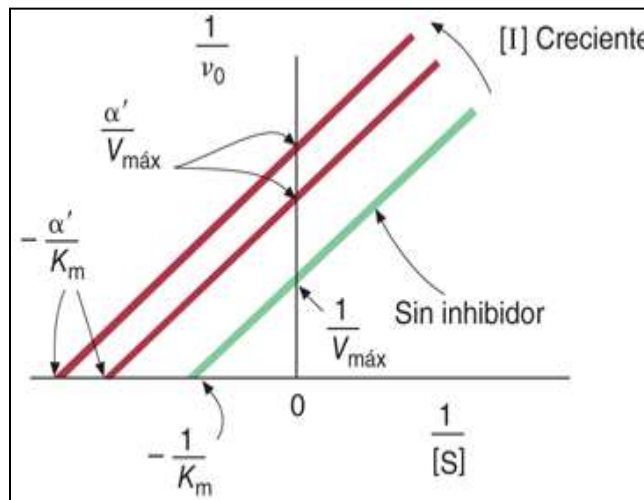


Figura 6. Representación gráfica de la inhibición acompetitiva.

c). *Inhibidores mixtos*: en este grupo se encuentran las moléculas que se unen en un sitio distinto al del sustrato, pero se pueden unir tanto a la enzima libre, como al complejo [ES], incrementando el valor de K_m y disminuyendo el valor de V_{max} (Figura 7) (Nelson, Cox, 2015).

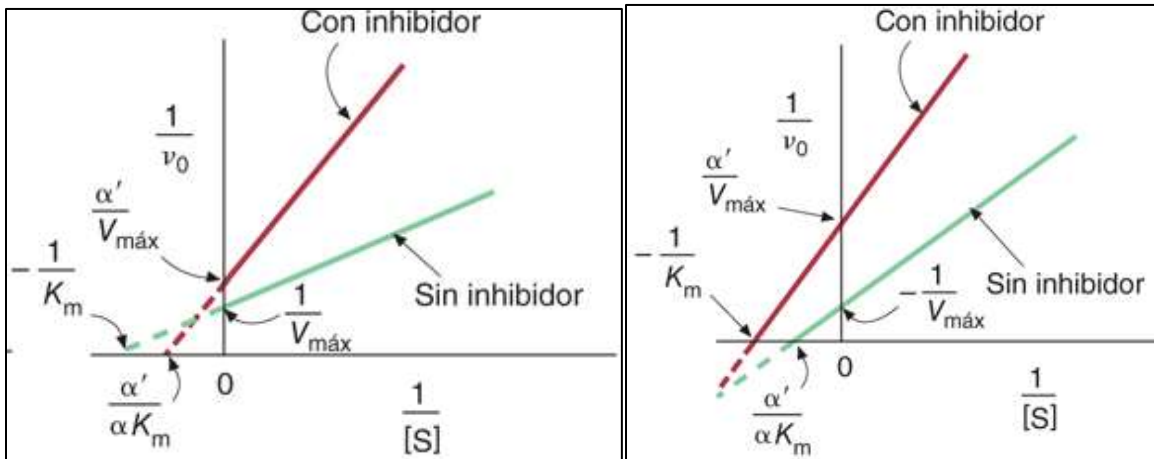


Figura 7. Representación gráfica de la inhibición no competitiva mixta.

- Inhibidores irreversibles: son moléculas que se unen de manera covalente a la enzima, destruyen un grupo funcional de la enzima que es vital para llevar a cabo su función o forman asociaciones no covalentes muy estables, en cualquiera de los 3 casos es imposible alcanzar la actividad normal de la enzima que se ha unido a estos compuestos.

2.2.3.2. Activadores enzimáticos.

Por lo general los activadores son moléculas inorgánicas pequeñas que estimulan la actividad catalítica de las enzimas pero no participan en la reacción, estos activadores pueden interactuar con la enzima libre o con el sustrato libre. Cuando el activador se une a la enzima libre, puede promover interacciones entre la enzima y el sustrato, que confieren mayor estabilidad catalítica y con ello promover un incremento en la actividad. Por otro lado, también existe el caso donde el activador se une al sustrato libre, dicho complejo puede ser reconocido con mayor afinidad por la enzima e incrementar la eficiencia catalítica de la reacción (Figura 8).

A) Unión a enzima libre	B) Unión a sustrato libre
$[E] + [A] \rightleftharpoons [EA]$ $[EA] + [S] \rightleftharpoons [EAS] \rightleftharpoons [EA] + [P]$	$[S] + [A] \rightleftharpoons [SA]$ $[SA] + [E] \rightleftharpoons [ESA] \rightleftharpoons [E] + [PA]$ $[PA] \rightleftharpoons [P] + [A]$

Figura 8. Tipos de interacción entre un activador y una enzima.

Los activadores se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Activadores esenciales: en este caso la enzima no lleva a cabo su función en ausencia del activador, lo anterior puede tener varias explicaciones:

a). El sustrato y el activador se unen en diferentes sitios de la enzima y pueden o no tener influencia entre ellos, pero solo se llevará a cabo la catálisis cuando se forme el complejo activador-enzima-sustrato [EAS]. En este sistema el activador puede afectar los valores de V_{max} y K_m dependiendo del valor de α .

b). El activador se une a la enzima libre y el sustrato solo se puede unir a este complejo [EA], de tal modo que solo el complejo [EAS] es capaz de llevar a cabo la catálisis, pero este sólo se puede formar si previamente se forma el complejo [EA] (Cardellá, 2013).

2. Activadores no esenciales: la reacción no requiere de la presencia del activador para llevarse a cabo; sin embargo, la presencia de este incrementa la actividad de la enzima.

2.3. Generalidades de los aldehídos.

Los aldehídos son moléculas altamente reactivas que se generan a partir de precursores endógenos y exógenos químicamente diversos. Los efectos mediados por aldehídos varían de los efectos homeostáticos y terapéuticos a los citotóxicos y genotóxicos. Una de las vías más importantes para el metabolismo de los aldehídos es su oxidación a ácidos carboxílicos por la acción de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) (Vasiliou et al., 2000). Como se mencionó previamente, los aldehídos pueden tener un origen endógeno o exógeno. Un ejemplo de aldehídos endógenos son: el retinaldehído, dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) y succinato semialdehído; moléculas importantes en el crecimiento y transmisión de señales respectivamente (Vasiliou et al., 2000). Dentro de los aldehídos exógenos se encuentran la glucosa (polihidroxialdehído) o a la vainillina, compuesto encargado del sabor en la planta de la vainilla. Algunos otros aldehídos útiles para el ser humano son el formaldehído (gas tóxico), el cual se utiliza en la industria para la producción de plásticos termoestables. Aunado a esto las soluciones estabilizadas de este compuesto se

usan como desinfectantes o preservadores de tejidos (Fieser et al.,1985). Otros aldehídos además del formaldehído, como acetaldehído y acroleína, provienen de la combustión incompleta de hidrocarburos, por lo que están presentes en el ambiente en forma de smog. Los aldehídos alifáticos y aromáticos, proporcionan olor y sabor a las frutas y vegetales. En los animales, algunos aldehídos son utilizados para la comunicación y defensa (Esterbauer et al., 1991).

Los aldehídos se pueden dividir en 4 grupos:

1. Alcanales saturados: solo presentan un grupo carbonilo como acetaldehído, propionaldehído o hexanal.

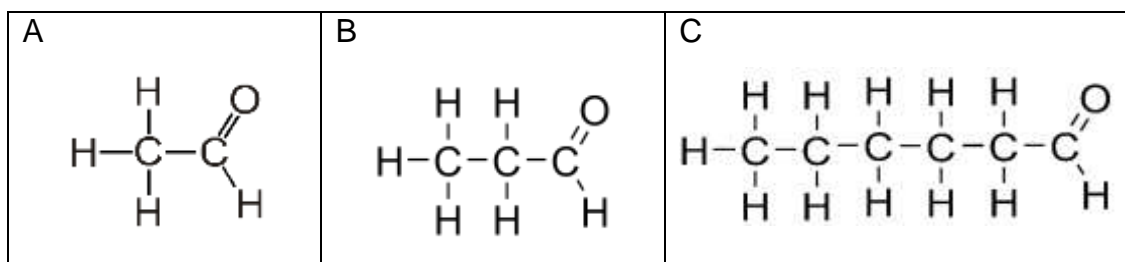


Figura 9. Estructura de A) acetaldehído, B) propionaldehído y C) hexanal.

2. Alquenes insaturados: presentan el grupo carbonilo y una sustitución con otro grupo funcional como el 4-hidroxi-2-nonenal y crotonaldehído.

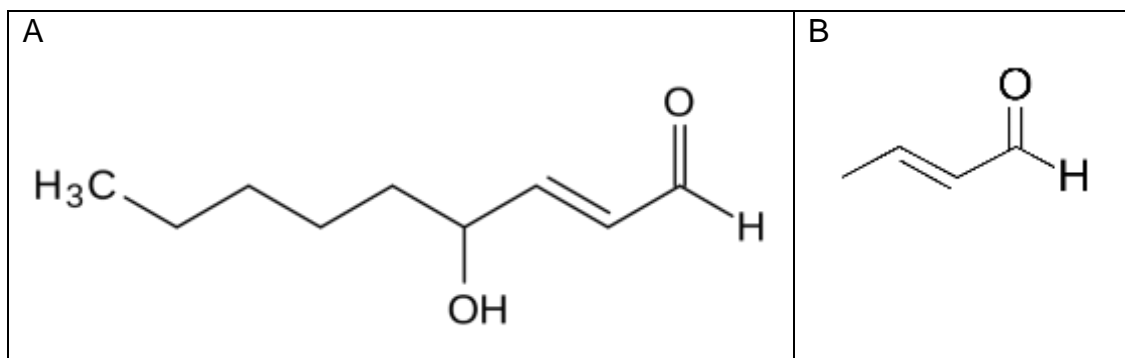


Figura 10. Estructura de A) 4-hidroxi-2-nonenal y B) crotonaldehído.

3. Aldehídos aromáticos: presentan en su estructura un grupo aromático como el benzaldehído.

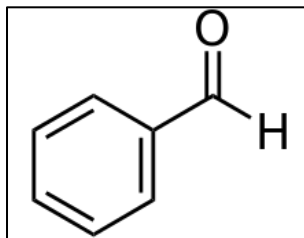


Figura 11. Estructura del benzaldehído.

4. Dicarbonilos: presentan dos grupos carbonilos en su estructura como el malondialdehído

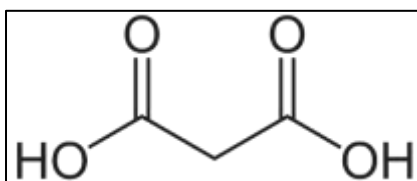


Figura 12. Estructura del malonaldehido.

La desintoxicación de los aldehídos se lleva a cabo a través de la oxidación de su grupo funcional carbonilo, para transformarlo en un ácido y reducir con esto su toxicidad, de esta manera se puede eliminar del organismo más fácilmente (Vasiliou et al., 2000).

2.4. Generalidades de las ALDHs.

Las ALDHs pertenecen a una superfamilia de enzimas que catalizan la conversión de una amplia variedad de aldehídos generados endógena y exógenamente a sus correspondientes ácidos; a través de una reacción dependiente de NAD(P)⁺ (Vasiliou et al., 2005).

Estas enzimas se encuentran localizadas en diferentes compartimentos celulares, como son: citosol, mitocondria, núcleo y retículo endoplásmico; se expresan de manera constitutiva y son tejidos específicas (Dolores, 2000). En el humano se han descrito 19 genes que codifican para diferentes isoformas de ALDHs y tres pseudogenes, siendo las isoformas más estudiadas ALDH1A1 (expresada principalmente en: hígado, cerebro, ojos, células rojas, riñón, testículos, pulmón)

(Hempel et al.,1984; Zhai et al.,2001; Picklo et al., 2001; Patel et al.,2008; Lassen et al., 2007); ALDH2 (expresada principalmente en: corazón, cerebro, hígado) (Grünblatt et al., 2016; Bai et al., 2011; Chen et al., 2014; Li et al., 2018; Kwon et al., 2014) y ALDH3A1 (expresada principalmente en: córnea, estómago, hígado, tracto urinario y algunos tipos de cáncer (Patel et al.,2008; Lassen et al., 2007; Lindahl et al., 1992). Se ha demostrado que mutaciones en alguno de estos genes pueden ocasionar problemas en el metabolismo, como lo son el síndrome de Sjögren-Larsson, la hiperprolinemia de tipo II y la aciduria γ -hidroxibutírica, que son enfermedades asociadas a un mal funcionamiento de las ALDHs. Por otro lado, existen reportes en los cuales la deficiencia de estas enzimas, se asocia a la predisposición o aparición de enfermedades como Parkinson, Alzheimer, cáncer, entre otras (Vasiliou et al., 2004). Aunque la principal función de las ALDHs es convertir los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, se ha determinado que algunas isoformas también pueden catalizar la hidrólisis de ésteres (actividad esterasa) (Sládek, 2003).

La presencia y actividad de las diferentes ALDHs ha sido asociada a otras funciones (Figura 13); en el caso de la ALDH1A1, se ha descrito que esta enzima es capaz de unir andrógenos en fibroblastos genitales (Vasiliou et al., 2004). En la córnea y el cristalino de mamíferos se han detectado altos niveles de expresión de ALDH1A1 y ALDH3A1 y se ha determinado que además de cumplir con su función catalítica, estas enzimas pueden servir como filtro contra la radiación UV, proceso involucrado en la formación de cataratas (Piatigorsky,2001; Stagos et al., 2010). Por otro lado, se ha propuesto a ALDH1A1 como una proteína de unión a flavopiridol y a daunorrubicina en carcinoma de pulmón e hígado de rata respectivamente (Vasiliou et al., 2004).

En el caso de la ALDH2, se ha propuesto que otra de sus funciones es la de nitrato reductasa, generando dinitrato de 1,2-glicerilo y nitrito a partir de nitroglicerina utilizada en el tratamiento de angina de pecho, falla congestiva cardiaca e infarto al miocardio, lo que da paso a la producción de GMPc que promueve la vasodilatación (Sydow et al., 2004). Por otro lado, se ha determinado que la ALDH2 es capaz de

metabolizar el acetaminofén, contribuyendo a su fácil eliminación del organismo, contrarrestando los daños que pueda generar su acumulación (Vasiliou, et al., 2000). Además, se ha descrito que estas enzimas contribuyen a mantener el equilibrio redox en la célula, pues existen reportes donde se indica que tanto ALDH3A1 como ALDH1A1, contienen con el estrés oxidante a través de la generación de NADH y NADPH, los cuales proveen de poder reductor a la célula (Uma et al., 1996).

Por último, la ALDH7A1 o antiquitina, es expresada en múltiples compartimentos subcelulares (citósol, núcleo y mitocondrias), protegiendo contra el estrés hiperosmótico mediante la generación de osmolitos y el metabolismo de aldehídos tóxicos (Brockner et al., 2010).

A continuación, se resumen las principales características propuestas para algunas de estas enzimas.

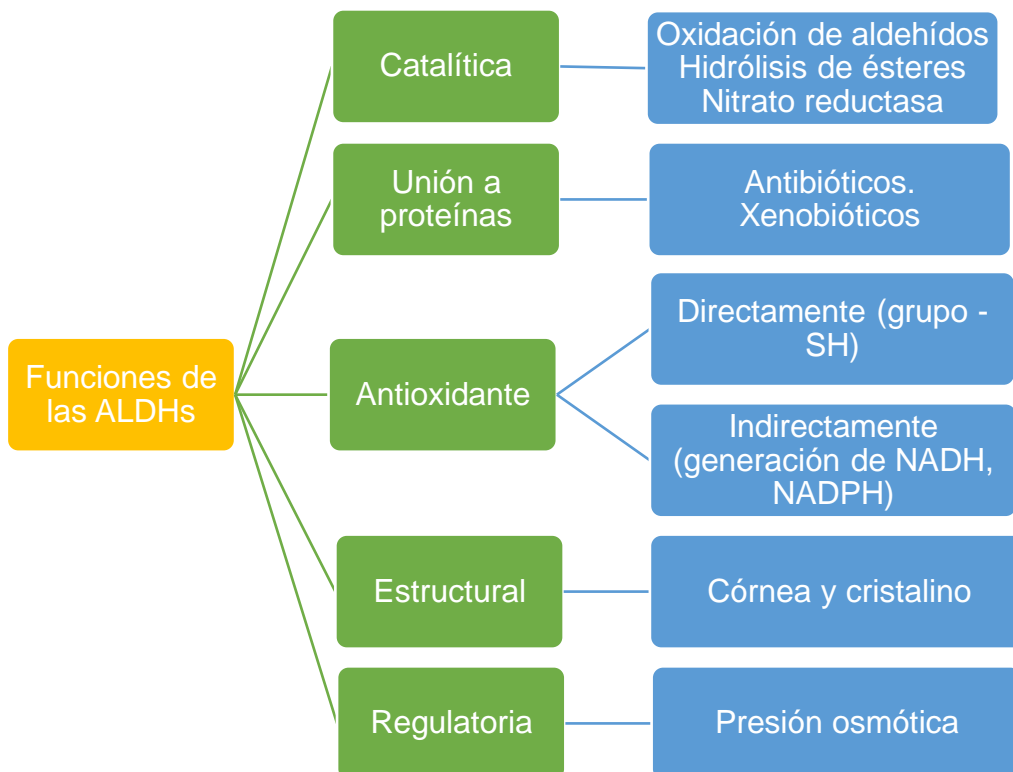
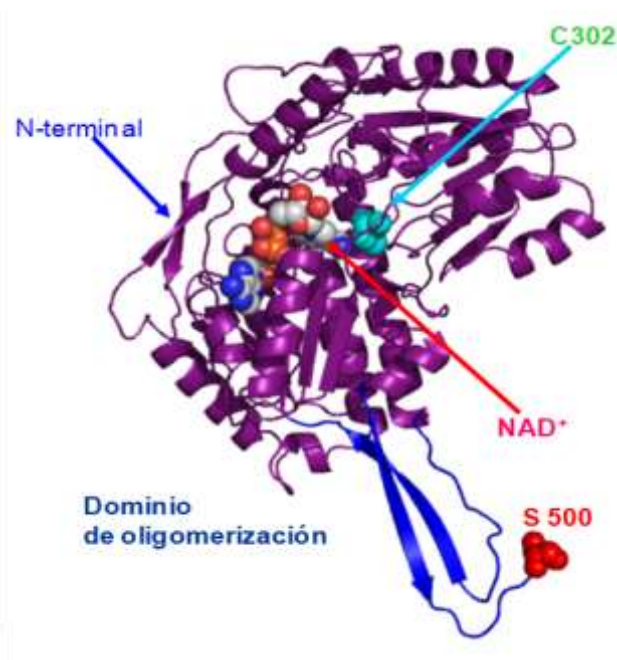


Figura 13. Diferentes funciones de las ALDHs en la célula.

2.5. Estructura de las ALDHs.

A nivel estructural, estas enzimas pueden ser tetrámeros (ALDH1A1, ALDH2, ALDH5A1) o dímeros (ALDH3A1), conformados por subunidades idénticas de aproximadamente 500 aminoácidos (Figura 14). Cada subunidad posee tres dominios: el dominio catalítico, el dominio de unión a la coenzima y el dominio de oligomerización (Moore et al., 1998).

El sitio activo de las ALDHs se encuentra en la base de un túnel hidrofóbico de 12 Å de longitud, el cual se encuentra frente al sitio de unión del cofactor y cerca de la interface tetramérica. Se ha sugerido que los aminoácidos que recubren el túnel son los que confieren la especificidad por el sustrato a cada enzima. Aunado a lo anterior, se sabe que el cofactor (NAD^+) se une a la enzima formando 10 puentes de hidrógeno, de los cuales 4 involucran a los residuos Lys192 y Glu399 altamente conservados en todas las isoformas (Ni et al., 1997).



(Rodríguez-Zavala y Weiner, 2002)

Figura 14. Estructura tridimensional de una subunidad de ALDH.

2.6. Mecanismo general de reacción de las ALDHs.

El mecanismo cinético de estas enzimas es secuencial ordenado (Figura 15), donde el sustrato A es el NAD^+ y el sustrato B es el aldehído. Aunque las diferentes ALDHs

comparten el mismo mecanismo catalítico, la especificidad con la que unen a los diversos sustratos difiere entre las isoformas (Wang et al., 2009). Esta diferencia se debe a los aminoácidos que conforman el sitio activo de estas enzimas (Koppaka et al., 2012). Sólo se ha reportado una isoforma que no comparte el mismo mecanismo catalítico, esta isoforma es la ALDH6, que utiliza como cofactor CoA en lugar de NAD^+ (Min et al., 1988).

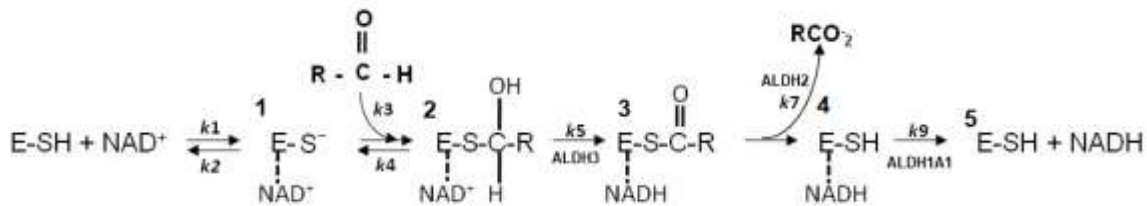


Figura 15. Mecanismo de reacción de las ALDH dependientes de NAD^+ .

Dentro del sitio activo de las ALDHs existen tres residuos altamente conservados (Lys192, Glu268, Cys302), los cuales están involucrados en la catálisis. El mecanismo de reacción, se lleva a cabo en cinco etapas:

1. Activación de la cisteína catalítica, la cual se lleva a cabo por la transferencia de un protón de la cisteína a una molécula de agua activada; la molécula de agua es activada por el residuo E268 al arrancarle un protón, ya que este residuo funciona como una base general.
2. El ataque nucleofílico sobre el aldehído por el grupo tiolato de la cisteína reactiva.
3. Formación de un intermediario tiohemiacetal tetrahédrico, seguido por la transferencia de un hidruro al anillo de piridina del NAD^+ , para formar el NADH.
4. Hidrólisis del intermediario tioéster resultante, para lo cual se requiere otra molécula de agua activada por el residuo E268, tal como ocurre en el primer paso de la reacción.
5. Disociación del cofactor reducido (NADH) y regeneración de la enzima libre para dar paso a un nuevo ciclo catalítico mediante unión a NAD^+ (Hempel et al., 1999).

Si bien, las diferentes isoformas presentan el mismo mecanismo general de reacción, el paso limitante de la reacción difiere para cada una de ellas, siendo éste la liberación de la coenzima reducida (k_9) para ALDH1A1, la liberación del acilo (k_7) para la ALDH2 y la transferencia del hidruro (k_5) para ALDH3A1 (Figura 15).

2.7. Moduladores de la actividad de las ALDHs.

El estudio de moduladores de las ALDHs ha cobrado gran importancia, debido a que estos compuestos podrían utilizar en terapias que ayuden a contrarrestar el daño generado por la acumulación de aldehídos en patologías en las cuales la actividad de estas enzimas se ve comprometida. A la fecha son pocos los compuestos que se han reportado y caracterizado cinéticamente como moduladores de las ALDHs. Sin embargo, algunos son actualmente utilizados en la clínica usando como blanco terapéutico a las ALDHs.

- Inhibidores de las ALDHs

Cianamida: esta molécula es utilizada terapéuticamente, en Europa, Canadá y Japón, debido a su función como agente aversivo al alcohol. En realidad, la cianamida es un profármaco y uno de sus metabolitos es el que actúa como inhibidor de la actividad de aldehído deshidrogenasa ($K_i=10 \mu\text{M}$ para ALDH2). La producción de este metabolito requiere catalasa y peróxido de hidrógeno para formar N-hidroxicianamida, que posteriormente se descompone a cianuro (concentraciones no tóxicas) y nitroxilo el cual es el metabolito activo capaz de inhibir la función de ALDH de forma reversible, mediante la formación de puentes disulfuro entre cisteínas vecinales en el sitio activo de la enzima. Se ha determinado que también existe una inhibición irreversible la cual esta mediada por la formación de sulfinamidas (De Master et al., 1998).

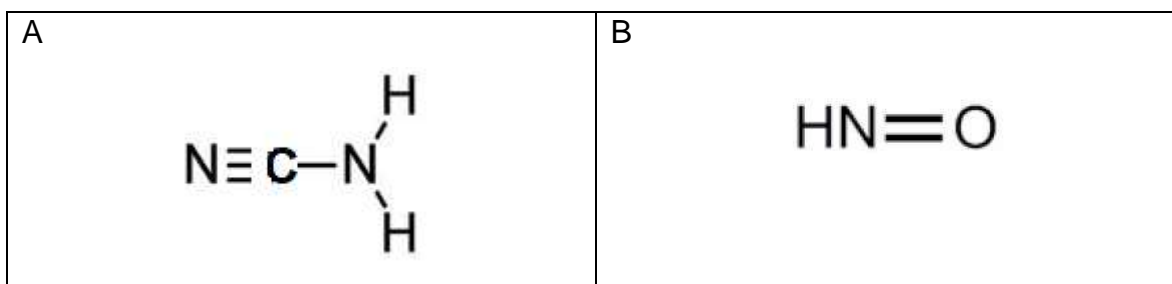
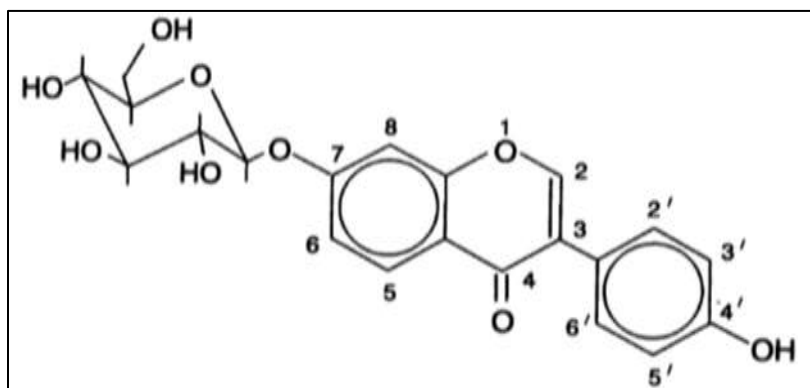


Figura 16. Estructura de la A) Cianamida y B) nitroxilo.

Daidzina: es una isoflavona aislada a partir de la raíz de *Pueraria lobata* de la familia de las *Fabáceas*, ha sido utilizada para el tratamiento de cáncer y la adicción o dependencia al alcohol. Esta molécula, en particular es un potente, reversible y selectivo inhibidor de la ALDH2 ($K_i=40 \text{ nM}$). Este inhibidor es competitivo con respecto al aldehído e incompetitivo con respecto al NAD^+ .



(Lowe et al., 2008)

Figura 17. Estructura de la Daidzina.

Disulfiram (DSF): es un profármaco utilizado en la terapia de personas adictas al alcohol, ya que inhibe de forma irreversible la actividad de ALDH (ALDH1A1, $K_i=0.15 \mu\text{M}$ y ALDH2, $K_i=1.45 \mu\text{M}$), lo cual genera elevados niveles de acetaldehído después de su ingestión, produciendo náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión. Este compuesto puede inhibir directamente a la enzima o a través del dietilditiocarbamato (DDC) (ALDH1A1, $K_i=0.27 \mu\text{M}$ y ALDH2, $K_i=2.2 \mu\text{M}$), metabolito que se genera de la reducción del DSF, ambos pueden formar aductos con la cisteína catalítica de la enzima (Cys 302 en los casos de ALDH1A1 y ALDH2), inhibiendo su actividad (Lipsky et al., 2001).

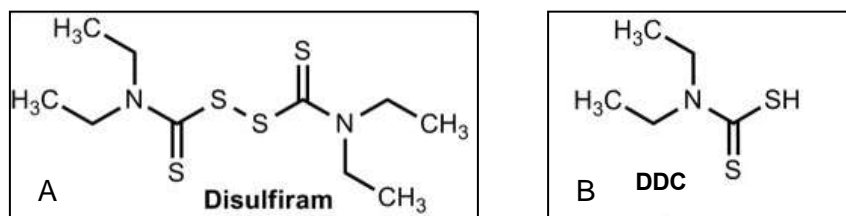


Figura 18. Estructura del A) disulfiram y B) dietilditiocarbamato (DDC)

- Activadores de las ALDHs.

ALDA-1 (N-(1,3-Benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida): es una molécula pequeña capaz de activar a la ALDH2 y restablecer la actividad de la variante

asiática ALDH2*2. Se ha empleado en diversos modelos fisiopatológicos, donde su presencia disminuye el estrés oxidante a través de la activación de la ALDH2 (Pérez-Miller et al., 2010). Sin embargo, también se ha demostrado que es capaz de activar a la ALDH1A1 (Belmont-Díaz et al., 2016). Este compuesto, se une en la entrada del túnel por donde ingresa el aldehído al sitio activo, dejando libres los residuos importantes para la catálisis (Cys302 y Glu268), disminuyendo el pK_a del sitio activo y favoreciendo la catálisis (Chen-Ho et al., 2008) (Belmont-Díaz et al., 2016).

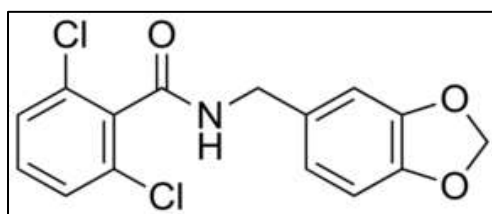


Figura 19. Estructura de ALDA-1.

Tamoxifen: es un fármaco que se emplea en la terapia de pacientes que han sido diagnosticados con cáncer de mama. Sin embargo, se ha descrito que es capaz de aumentar la actividad de la ALDH1A1 hasta 2.5 veces y protegerla de la desnaturalización térmica. Se propone que esto se debe a que el tamoxifen se une al sitio activo de la enzima de manera similar al ALDA-1. Otra propuesta para explicar la activación de la enzima es el incremento de 3 veces en el valor de K_d por el NADH en presencia de tamoxifen, lo cual favorece la liberación de la coenzima reducida que es el paso limitante para esta isoenzima, incrementando de esta forma la velocidad global de la reacción (Belmont-Díaz et al., 2015).

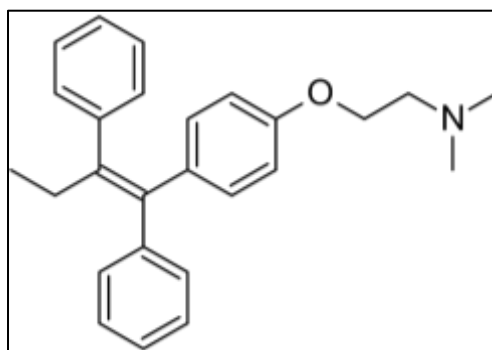


Figura 20. Estructura del tamoxifen.

Safrol: conocido también como ALDA-89, es un activador “selectivo” de la ALDH3A1. Sin embargo, a la fecha no se ha descrito su mecanismo de acción. Este compuesto se ha catalogado por la IARC (International Agency for Research in Cancer) como un carcinógeno débil en ratas. Aunado a esto, se ha prohibido la utilización en alimentos por la FDA (Banh et al., 2011).

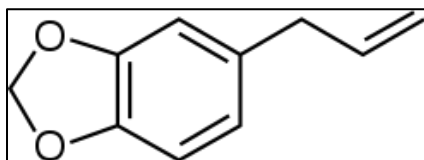


Figura 21. Estructura del safrol (ALDA-89).

Debido a todo lo anterior, la búsqueda de moduladores de la actividad de estas enzimas es muy importante, ya que esto nos permitiría diseñar estrategias terapéuticas con el fin de disminuir o incrementar la actividad de las ALDHs en diferentes fisiopatologías.

3. Antecedentes.

En 1982, Kitson y colaboradores describieron a la 2-2'-ditiopiridina (aldritol, figura 22) como activador de la isoforma ALDH1A1 (Figura 23); sin embargo, en ese reporte no se realizó la caracterización cinética completa de este compuesto. En dicho trabajo el aldritol solo se utilizó por la similitud estructural con el dietilestilbestrol (Figura 22), compuesto que previamente había sido identificado como un activador de esta enzima, por lo que en este trabajo se propuso profundizar en la caracterización cinética del efecto del aldritol sobre la ALDH1A1, así como en el tipo de interacción del compuesto con la enzima, para entender el mecanismo a través del cual este compuesto es capaz de activar a la ALDH1A1.

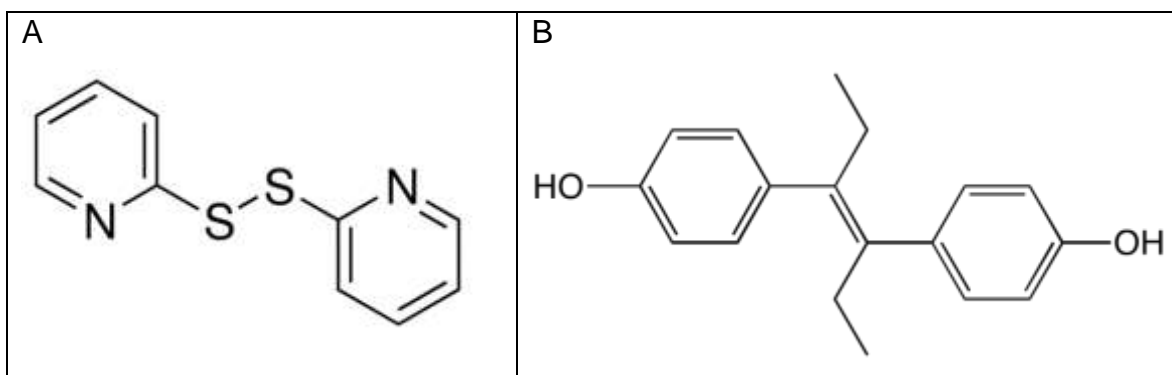


Figura 22. Estructura de A) aldritol y B) dietilestilbestrol

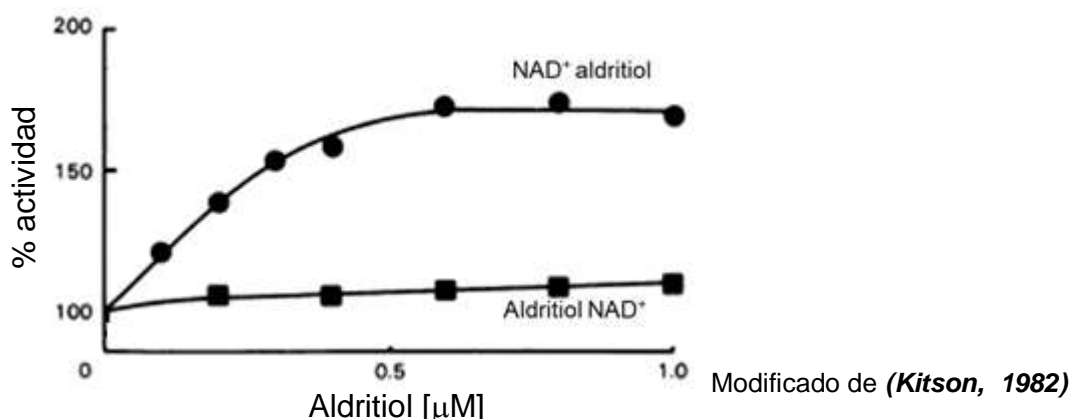


Figura 23. Efecto del aldritol sobre la actividad de ALDH1A1. Se observa el efecto del aldritol sobre la enzima en función de la adición de NAD⁺ previo a la adición del aldritol (●) o posteriormente a la adición del aldritol (■).

Previamente, se encontró que la ALDH1A1 posee dos cisteínas (301 y 302) en el sitio catalítico (Yoval-Sánchez et al., 2012); por lo cual, la propuesta de este trabajo fue que el aldritol se une a la cisteína adyacente a la cisteína catalítica (Figura 24) y de esta manera promueve un cambio conformacional en el sitio catalítico, que favorece el incremento en la actividad de la enzima.

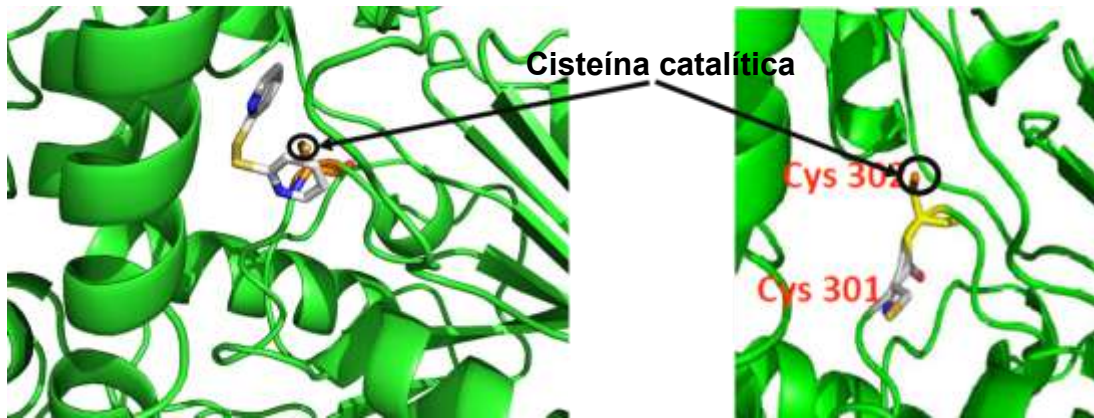


Figura 24. Arreglo estructural de las cisteínas presentes en el sitio catalítico de ALDH1A1. Se propone a la cisteína 301, adyacente a la cisteína catalítica, como blanco de unión del aldritol.

4. Hipótesis.

Por su carácter de reactivo de cisteínas, el aldritol se une de manera irreversible al sitio activo de la ALDH1A1, modificando el ambiente hidrofóbico promoviendo el incremento de la actividad.

5. Objetivo general.

Estudiar el efecto del aldritol sobre las propiedades cinéticas de la ALDH1A1 humana, así como el tipo de interacción del compuesto con la enzima.

6. Objetivos particulares.

1. Caracterizar cinéticamente a la ALDH1A1 humana recombinante en presencia de aldritol.
2. Determinar la susceptibilidad de la ALDH1A1 a aldehídos producto de la lipoperoxidación en presencia de aldritol.
3. Caracterizar el tipo de interacción del aldritol con la ALDH1A1.
4. Evaluar el efecto protector del aldritol ante el estrés oxidante en un modelo bacteriano.

7. Materiales y métodos.

7.1 Materiales.

Acroleína, glicerol, 4-HNE, 4-HHE, propionaldehído, imidazol, IPTG, 2-mercaptoetanol, NAD⁺, NADH, cloruro de níquel, cloruro de sodio, fosfato de sodio, extracto de levadura y triptona provienen de Sigma-Aldrich. Chelating sepharoseTM fast flow proviene de Pharmacia Biotech. El marcador de peso molecular preteñido de amplio rango (7.1-209 kDa) proviene de BIO-RAD.

7.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Las células de *E. coli* (BL21) que contienen el vector de expresión con el gen de la proteína ALDH1A1 (Figura 25), se inocularon en 2 L de medio 2XYT con 40 mL de un cultivo previo de toda la noche (medio LB). El cultivo fue suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 25 µg/mL de cloranfenicol, y se mantuvo a 37°C en agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. La expresión de la proteína de interés fue inducida con IPTG 0.4 mM y se continuó la incubación por 12 horas. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y posteriormente se realizaron dos lavados cada uno con 100 mL de NaCl 0.9%. Una vez obtenido el botón de células, éste fue resuspendido en un amortiguador compuesto de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.5), NaCl 500 mM y 2-mercaptoetanol 3 mM (amortiguador A) a 4°C. Las células se rompieron por sonicación durante 15 ciclos de 15 segundos. El extracto celular se centrifugó a 45000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se inyectó en una columna de afinidad (Chelating sepharoseTM fast flow) de níquel, previamente equilibrada con 100 mL de amortiguador A a 4°C. Posteriormente, la columna se lavó con 50 mL de amortiguador A suplementado con imidazol 20 mM y la proteína recombinante fue eluída de la columna usando 100 mL de un gradiente lineal de imidazol (20-250 mM).

La ALDH1A1 purificada se concentró y lavó usando filtros Amicon (MWCO 30 KDa). Finalmente, se guardó con glicerol 50% a -20°C hasta su utilización.

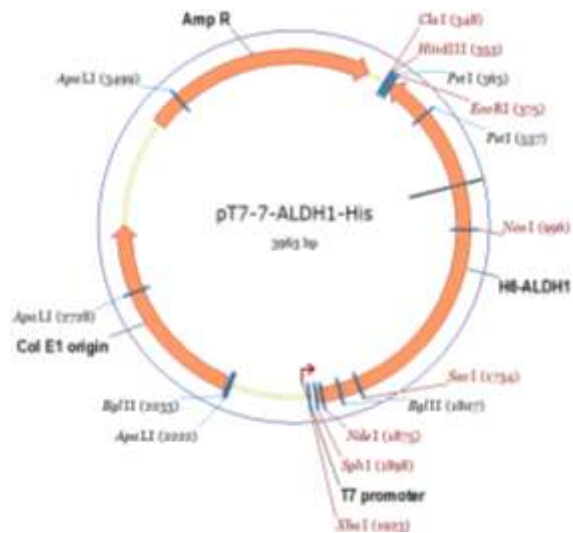


Figura 25. Vector de sobre-expresión de la enzima ALDH1A1.

7.3. Cuantificación de proteínas.

Con el fin de eliminar agentes que pudieran interferir en la cuantificación de la proteína, se tomó una alícuota de 50 μ L de ésta y se precipitaron con TCA al 13% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y se recuperó la fracción precipitada, la cual fue resuspendida en una solución de NaOH 0.1 N y SDS al 5% y se llevó a un volumen final de 50 μ L. La cuantificación se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Cardellá, 2013). Este método, se lleva a cabo en un medio alcalino, donde los enlaces peptídicos de las proteínas reducen al Cu^{2+} . Los iones Cu^+ producidos, se unen a dos moléculas de BCA y al hacerlo, modifican su estructura de tal manera que cambia la coloración de la solución de azul a púrpura, el cual absorbe a 562 nm.

Se preparó una solución concentrada de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL para poder realizar la curva patrón como se indica en la siguiente tabla:

BSA (μ g)	μ L de H ₂ O	BSA (μ g)	μ L de H ₂ O
0	100	40	60
5	95	60	40
10	90	80	200
20	80	100	0

Se adicionaron 2 mL de la mezcla de reacción (ácido biconínico (reactivo A) y sulfato de cobre (reactivo B) a los tubos de la curva y a los que contienen la muestra de interés. Posteriormente, se incubaron 15 min a 60°C y se determinó la absorbancia a 562 nm.

7.4. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y determinación de pureza de la ALDH1A1.

Se realizó el seguimiento de la purificación de la proteína a través de una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (16%). En esta técnica, el SDS desnaturiza a las proteínas y les confiere carga neta negativa, por lo cual migran hacia el ánodo y se separan en función de su peso molecular. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga (anexo A), en una relación 1:1 y se sometieron a ebullición durante 5 minutos para favorecer la desnaturización. Posteriormente, se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 150 volts, durante 45 minutos en el amortiguador de corrida. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie (anexo A) por 45 minutos y se destiñó con una mezcla de ácido acético: metanol: H₂O (10%: 50%: 40%).

El porcentaje de pureza de la proteína se determinó por medio de un análisis densitométrico del gel, utilizando el programa ImageJ.

7.5. Análisis cinético.

7.5.1. Actividad de ALDH.

La actividad enzimática de las ALDHs se determinó en amortiguador de fosfatos a 25°C en presencia de NAD⁺ 1 mM, la reacción se inició adicionando propionaldehído y se siguió la aparición de NADH como producto de la reacción a 340 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800); estos experimentos se realizaron en presencia o ausencia de aldritol.

Los resultados se analizaron por regresión no lineal, usando la ecuación de Michaelis-Menten y realizando el correspondiente gráfico de Lineweaver-Burk (doble recíproco) de los datos obtenidos utilizando el software Origin v.8.0

7.5.2. Evaluación del efecto protector del aldritol sobre la actividad de la ALDH1A1 en presencia de inhibidores.

Se evaluó el efecto del aldritol sobre la actividad de ALDH en presencia de disulfiram (DSF) un inhibidor clásico de ALDH; este ensayo se determinó por métodos espectrofotométricos, tal como se describe anteriormente a diferentes concentraciones del inhibidor. El inhibidor fue añadido a la mezcla de reacción antes de la adición del aldehído. Estos experimentos se realizaron en presencia o ausencia de aldritol (1 μ M) y se determinaron los valores de K_i correspondientes.

7.5.3. Efecto de la temperatura.

Para determinar el efecto del aldritol sobre la estabilidad estructural de la enzima, se incubaron 160 μ g de la enzima en ausencia y presencia de aldritol (1 μ M) y en condiciones saturantes de NAD⁺ (1 mM). Dicha reacción se incubó a diferentes temperaturas (25°C, 35°C, 45°C y 60°C) en función del tiempo (0, 1, 2, 5, 8, 10 y 15 min). La actividad enzimática remanente de cada condición, se determinó al adicionar propionaldehído (1 mM), siguiendo la generación de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro de diodos marca Agilent, modelo 8453.

7.5.4. Interacción enzima-aldritol.

Con el fin de elucidar el tipo de interacción enzima-aldritol (covalente o fuertemente unida), se realizó un ensayo de dilución. Se preparó una mezcla de reacción de la enzima (20 μ g), en amortiguador de fosfatos a 25°C en presencia de NAD⁺ (1 mM) y aldritol (1 μ M) en un volumen final de 500 μ L. Una vez realizada dicha mezcla se determinó la actividad enzimática adicionando propionaldehído (1 mM). Posteriormente, la reacción fue diluida 31 veces en tubos AMICON® (30 kDa), con el fin de eliminar el aldritol que no reaccionó con la enzima y disminuir la concentración de aldritol por debajo de su $K_{0.5}$. Finalmente, se evaluó nuevamente la actividad enzimática y fue comparada con la obtenida para el control.

7.6. Evaluación de la protección por aldritol en un modelo de estrés oxidante.

Se generó un modelo de estrés oxidante en células de *E. coli* (BL21) que contienen un plásmido con el gen de la ALDH1A1. Los experimentos fueron realizados en medio mínimo (anexo A), con cultivos de 0.1 de absorbancia a 600 nm y se registró el crecimiento bacteriano cada hora. La inducción de la expresión de la proteína se realizó después de una hora de iniciado el cultivo, con IPTG 0.4 mM. Diferentes concentraciones de aldritol (0, 10 y 50 μ M) se agregaron después de 2 horas de la inducción y finalmente 1 hora después, se realizó una adición de H₂O₂ 5 mM. El registro del crecimiento fue determinado como absorbancia a 600 nm y se continuó hasta llegar a la fase estacionara (9 horas).

7.7. Efecto del complejo glutatión-aldritol.

Se realizó una mezcla de aldritol y glutatión 1:2 (1 mM: 2 mM), la cual se dejó reaccionar toda la noche y de la cual se registraron espectros al tiempo 0 y a las 24 hrs de iniciada la reacción, esto con el fin de determinar la concentración de aldritol libre y acomplejado (aldritol-GSH). Se utilizaron diferentes concentraciones del complejo aldritol-GSH para determinar el efecto sobre la actividad enzimática de la ALDH1A1, siguiendo la aparición de NADH, tal como se describió previamente. Los resultados se analizaron por regresión no lineal utilizando el software Origin v.8.0

7.8. Efecto del aldritol sobre la actividad de la alcohol deshidrogenasa.

Con el fin explorar la especificidad del aldritol, se evaluó la actividad de una alcohol deshidrogenasa (ADH) comercial en presencia y ausencia del aldritol (1 μ M). Este ensayo se realizó en amortiguador de fosfatos (pH=8) a 25°C en presencia de Mg²⁺ (2 mM) y usando NADH (180 μ M) como sustrato; la reacción se inició con el aldehído correspondiente (propionaldehído 5 mM) y se siguió la desaparición de NADH a 340 nm.

8. Resultados.

8.1 Sobreexpresión y purificación de la aldehído deshidrogenasa humana clase 1.

La ALDH1A1 se purificó a través de una cromatografía de afinidad, como se describe previamente en la sección de Materiales y Métodos. En la figura 26 se muestran algunas fracciones del proceso de purificación corridas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. Posteriormente, se realizó un análisis densitométrico para determinar el porcentaje de pureza de la proteína, el cual fue mayor al 99%; por lo cual, una vez obtenida la proteína pura se determinó su actividad (Figura 27) y se procedió a realizar los experimentos correspondientes.

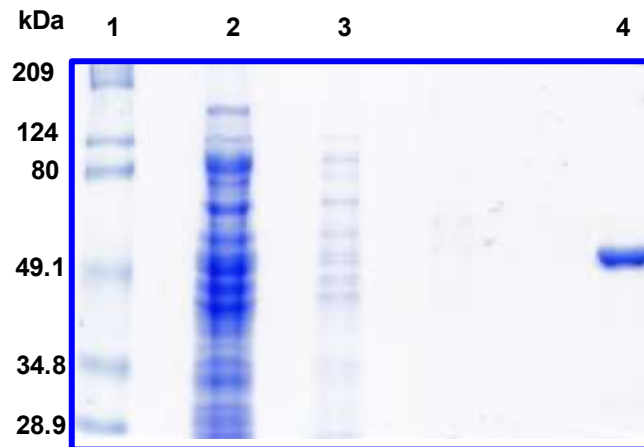


Figura 26. Fracciones de la marcha de purificación corridas en Gel SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular (BIO-RAD). Carril 2: Extracto crudo (bacterias). Carril 3: Elución con imidazol 5%. Carril 4: Enzima lavada y concentrada con amortiguador de fosfatos.

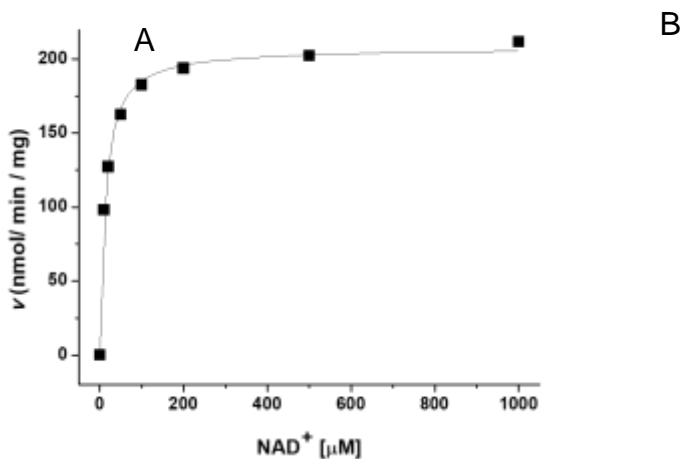


Figura 27. Actividad enzimática de la ALDH1A1. A) NAD⁺ variable con propionaldehído 1 mM y B) propionaldehído variable con NAD⁺ 1 mM.

8.2. Análisis cinético.

8.2.1. Determinación de $K_{0.5}$ por aldritol.

Se determinó el valor de $K_{0.5}$ de ALDH1A1 por aldritol, para lo cual se usaron concentraciones en un intervalo de 0 -1.2 μM de este compuesto y se mantuvieron fijas las concentraciones de NAD⁺ y propionaldehído (1 mM en ambos casos), estos ensayos se realizaron a pH 7.4 (Figura 28).

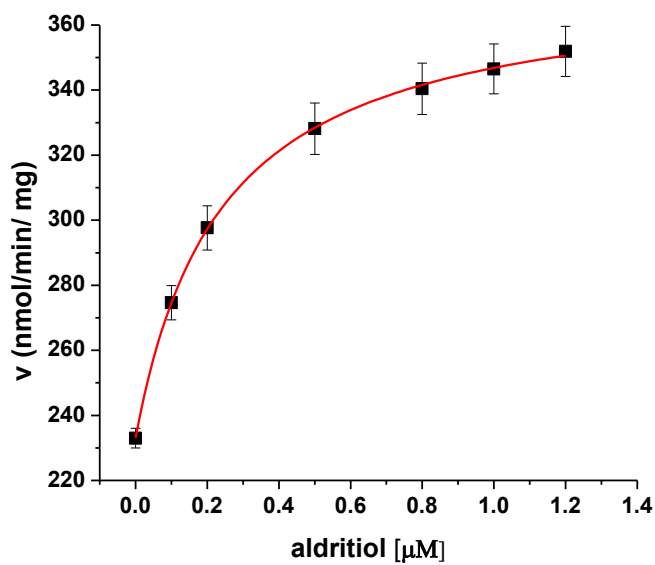


Figura 28. $K_{0.5}$ de ALDH1A1 por aldritol.

En la figura 28, se observa que el aldritol incrementa la actividad de ALDH1A1 50% y que el máximo de activación se alcanza entre 1 y 1.2 μM de aldritol. El valor obtenido de $K_{0.5}$ para el compuesto fue de 0.23 ± 0.03 ($n=3$). En base a estos resultados se estableció 1 μM como la concentración de aldritol a la cual se realizaron los experimentos siguientes.

8.2.2. Determinación de los valores de K_m y V_{max} en presencia de aldritol.

Una vez que se determinó la concentración de aldritol a la cual se alcanza la máxima activación, se evaluaron los parámetros cinéticos (K_m y V_m) por NAD^+ y propionaldehído, en presencia y ausencia de aldritol. En la figura 29 se muestra el perfil cinético obtenido al variar las concentraciones de NAD^+ y mantener fija la concentración del aldehído, el comportamiento obtenido corresponde a una hipérbola el cual se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, se realizó el gráfico de Lineweaver-Burk para este sustrato (Figura 30), se observó el mismo perfil cinético al variar las concentraciones de aldehído y mantener fija la concentración de NAD^+ (Figura 31). Se realizó el gráfico de Lineweaver-Burk para este sustrato, con el cual se hace evidente la presencia de un solo componente (Figura 32). En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos en cada caso.

Figura 29. Determinación de la K_m de ALDH1A1 por NAD^+ en ausencia (▪) y presencia de aldritol (•) con 10 μg de enzima y propionaldehído 1 mM.

Figura 30. Gráfico de Lineweaver-Burk de los datos de la figura 29.

Figura 31. Determinación de la K_m de ALDH1A1 por propionaldehído en ausencia (▪) y presencia de aldritol (•) con 10 μg de enzima y NAD^+ 1 mM.

Figura 32. Gráfico de Lineweaver-Burk de los datos de la figura 31

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la ALDH1A1 en presencia y ausencia de aldritol.

	NAD ⁺		Propionaldehído	
	control	aldritiol (1 μM)	control	aldritiol (1 μM)
<i>Km</i> [μM]	12±0.29	19±0.71	16±0.62	18±1
<i>Vm</i> [nmol/min/mg]	207±12	301±9	206±12	307±5
<i>Vm/Km</i> [min ⁻¹]	17±0.86	16±0.45	13±0.95	17±2

Se observó un ligero incremento en los valores de *Km* por ambos sustratos en presencia de aldritol. Indicando que el compuesto afecta la afinidad con la cual los sustratos se unen a la enzima.

Como se puede observar, el cambio más relevante fue el incremento de 50% sobre la velocidad máxima. A pesar de ese incremento en la *Vmax*, no hubo cambios importantes en la eficiencia catalítica.

8.2.3. Aldehídos producto de la lipoperoxidación.

Se evaluó la capacidad catalítica de ALDH1A1 por algunos productos de la lipoperoxidación (acroleína, 4-HHE y 4-HNE), en ausencia y presencia de aldritol. Como se puede observar en las figuras 33, 35 y 37, el aldritol incrementa 34, 53 y 48% la *Vmax* de la enzima para acroleína, 4-HHE y 4-HNE respectivamente.

Figura 33. Determinación de la K_m de ALDH1A1 por acroleína en ausencia (▪) y presencia de aldritol (•) con 10 μg de enzima y NAD^+ 1 mM.

Figura 34. Gráfico de Lineweaver-Burk de los datos de la figura 33.

Figura 35. Determinación de la K_m de ALDH1A1 por 4-HHE en ausencia (▪) y presencia de aldritol (•) con 10 μg de enzima y NAD^+ 1 mM.

Figura 36. Gráfico de Lineweaver-Burk de los datos de la figura 35.

Figura 37. Determinación de la K_m de ALDH1A1 por 4-HNE en ausencia (•) y presencia de aldritol (●) con 10 μg de enzima y NAD^+ 1 mM.

Figura 38. Gráfico de Lineweaver-Burk de los datos de la figura 37.

Tabla 2. Determinación de los parámetros cinéticos de la ALDH1A1 con aldehídos producto de la lipoperoxidación en ausencia y presencia de aldritol.

	Acroleína		4-HHE		4-HNE	
	control	aldritol (1 μM)	control	aldritol (1 μM)	control	aldritol (1 μM)
K_m [μM]	11 \pm 0.81	8\pm0.6	5	5	1.2 \pm 0.08	0.99\pm0.03
V_m [nmol/min/mg]	81 \pm 9	109\pm16	93	143	123 \pm 5	183\pm6
V_m/K_m [min^{-1}]	7 \pm 0.96	14\pm1.9	19	29	105 \pm 8	185\pm5

En la tabla anterior se muestra el resumen de los datos obtenidos, en los cuales se puede observar que la presencia de aldritol, no modifica de manera importante la afinidad de ALDH1A1 por estos aldehídos. Sin embargo, al incrementarse la V_{max} en todos los casos, esto se reflejó en un incremento significativo en la eficiencia catalítica de 2, 1.5 y 1.8 veces para acroleína, 4-HHE y 4-HNE, respectivamente.

8.2.4. Interacción entre el aldritol y ALDH1A1.

8.2.4.1. Evaluación del efecto protector del aldritol sobre la actividad de la ALDH1A1 en presencia de inhibidores.

Una vez realizada la caracterización cinética de la ALDH1A1 en presencia de aldritol, se realizaron diferentes experimentos con el fin de dilucidar qué tipo de interacción existe entre el compuesto y la enzima. El primer acercamiento se realizó a través de inhibidores de la enzima, específicamente el disulfiram (Figura 39), el cual se une de manera covalente a la cisteína catalítica generando una pérdida de función. Se determinó una CI_{50} en presencia y ausencia de aldritol ($1\mu\text{M}$), con el fin de elucidar el sitio de unión del aldritol y si este era capaz de proteger del daño causado por el disulfiram, lo cual no es muy claro debido a que el cambio en este parámetro no es significativo.

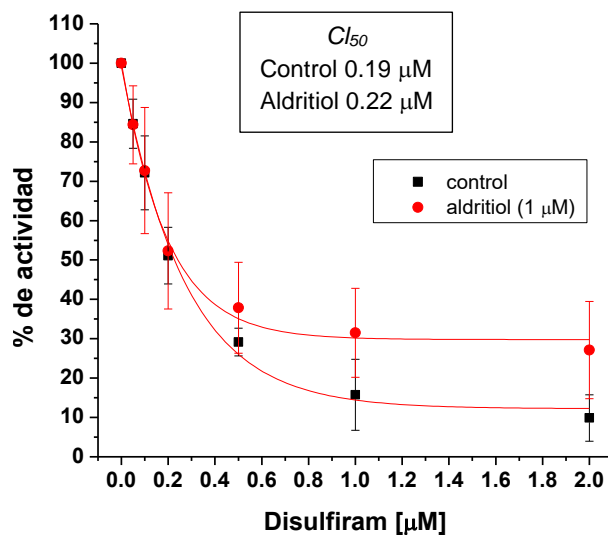


Figura 39. CI_{50} por disulfiram para ALDH1A1 en presencia (●) y ausencia (■) de aldritol ($1\mu\text{M}$). El medio de reacción contiene NAD^+ 1 mM, enzima 10 μg , DFS y la reacción se inicia con propionaldehído 1 mM.

8.2.4.2. Efecto de la temperatura.

Un segundo acercamiento se realizó analizando el efecto de la temperatura sobre la estabilidad estructural de la proteína, dicho experimento se realizó en ausencia y presencia de aldritol, incubando a la enzima a 25, 35, 45 y 60°C . El aldritol fue

capaz de preservar el 100% de la actividad de la enzima a 45°C, mientras que en ausencia de este, se pierde prácticamente el 50% de la actividad enzimática (Figura 40 y 41). Con el fin de reforzar el análisis de este ensayo se determinó la constante de inactivación a partir del gráfico de Arrhenius, en presencia y ausencia de aldritol (Figura 42), en las cuales se observa la protección a la inactivación por temperatura en presencia del aldritol y que en presencia del compuesto la energía de activación de la enzima disminuye.

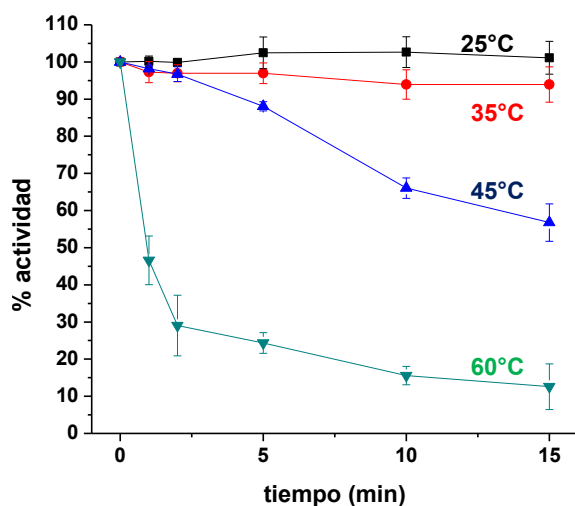


Figura 40. Inactivación de ALDH1A1 por temperatura. Se incubaron enzima 160 μg a las diferentes temperaturas. Posteriormente se determinó su actividad a 25°C con NAD^+ 1 mM y propionaldehído 1 mM.

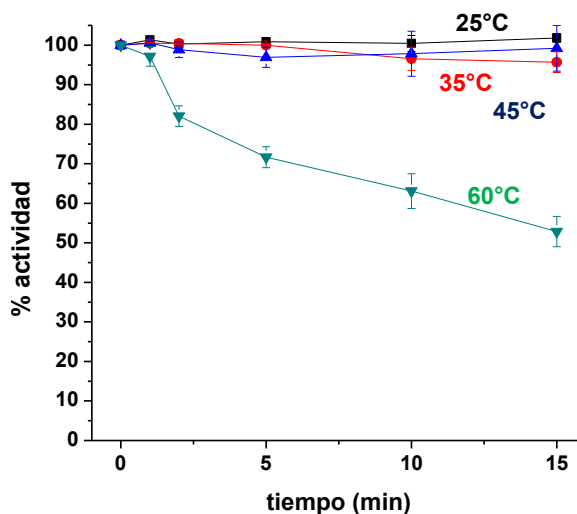


Figura 41. Protección de la inactivación por temperatura mediada por aldritol en ALDH1A1. Se incubaron enzima 160 μg y aldritol 1 μM a las diferentes temperaturas. Posteriormente se determinó su actividad a 25°C con NAD^+ 1 mM y propionaldehído 1 mM.

Tabla 3. Constantes de inactivación por temperatura para ALDH1A1 en presencia y ausencia de aldritol (1 μM).

Constante de inactivación en función de la temperatura		
Temperatura $^{\circ}\text{K}$	Control (min)	Aldritiol 1 μM (min)
298.15	0.0006	0.0002
308.15	0.0046	0.0003
318.15	0.0403	0.0008
333.15	0.6179	0.0269

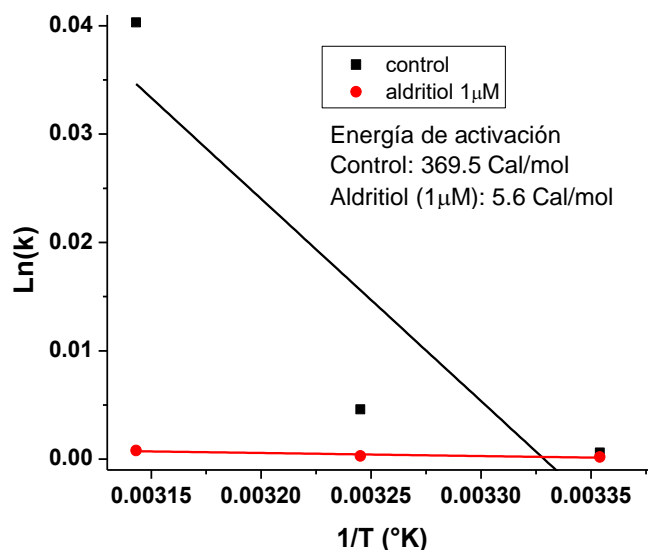


Figura 42. Gráfico de Arrhenius de las figuras 40 y 41 en presencia (•) y ausencia de aldritol (▪) (1 μM). Una vez obtenidas las constantes de inactivación para cada temperatura se calculó la energía de activación para ALDH1A1 en presencia y ausencia del aldritol.

8.2.4.3. Efecto de la dilución.

Con el fin de determinar si la interacción entre el aldritol y la enzima es de tipo covalente, se realizó un experimento de dilución, incubando previamente a la enzima en ausencia y presencia de este compuesto (1 μM) y posteriormente diluyendo 31 veces, esto con el fin de eliminar todo el aldritol que no reaccionó con la enzima, para después concentrar la mezcla de reacción tal como se describe en los materiales y métodos. Con respecto a esto, si la interacción aldritol-enzima

fuera débil, se esperaba que con la dilución/concentración se perdiera el efecto de activación; sin embargo, el efecto de activación se conservó, tal como se puede apreciar en la figura 43. Estos datos indican que el aldritol se une fuertemente a la enzima. Este tipo de análisis se podría complementar con espectrometría de masas, para evidenciar si la unión es realmente de tipo covalente o el compuesto solo se une fuertemente.

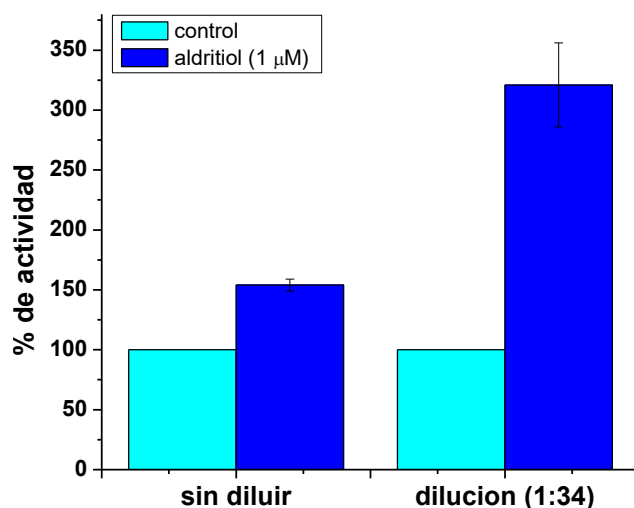


Figura 43. Efecto de la dilución sobre la interacción aldritol-ALDH1A1. Del lado izquierdo se muestra únicamente la incubación de la enzima en presencia y ausencia de aldritol. Del lado derecho de la gráfica, se muestra que la dilución, no disminuye el efecto de activación del aldritol sobre ALDH1A1.

Tabla 4. Porcentaje de actividad de ALDH1A1 antes y después de la dilución.

% de actividad (sin diluir)	
Control	Aldritol 1 μM
100	154±5
% de actividad (dilución (1:34) y concentración)	
Control	Aldritol 1 μM
100	321±35

8.2.5. Evaluación de la protección por aldritol en un modelo de estrés oxidante.

Para determinar el efecto del aldritol sobre el daño causado por estrés oxidante inducido por la adición de H_2O_2 , se realizaron curvas de crecimiento de células de *E. coli* (BL21) que sobre-expresan a la ALDH1A1, en presencia de diferentes concentraciones de dicho compuesto. Se observó que las células que contenían aldritol en presencia de H_2O_2 , crecieron de manera similar al control, mientras que las que no contenían aldritol dejaron de crecer después de agregar el H_2O_2 como se muestra en la figura 44.



Figura 44. Curva de crecimiento de células que sobre-expresan a ALDH1A1 a diferentes concentraciones de aldritol. Se pusieron a crecer células que expresan a ALDH1A1 en medio mínimo con aldritol 10 μ M y 50 μ M y posteriormente se adicionó H_2O_2 5 mM para observar el efecto del aldritol sobre el estrés oxidante.

8.2.6. Interacción glutatión-aldritol y su efecto sobre la actividad de ALDH1A1.

Como ya se había mencionado anteriormente el aldritol es un reactivo de cisteínas por lo que podría reaccionar directamente con el glutatión; por lo que se determinó el efecto de éste complejo sobre la actividad de la ALDH1A1. Se observó que este complejo actúa como un activador de la enzima, por lo que se procedió a determinar su $K_{0.5}$, la cual se muestra en la figura 45.

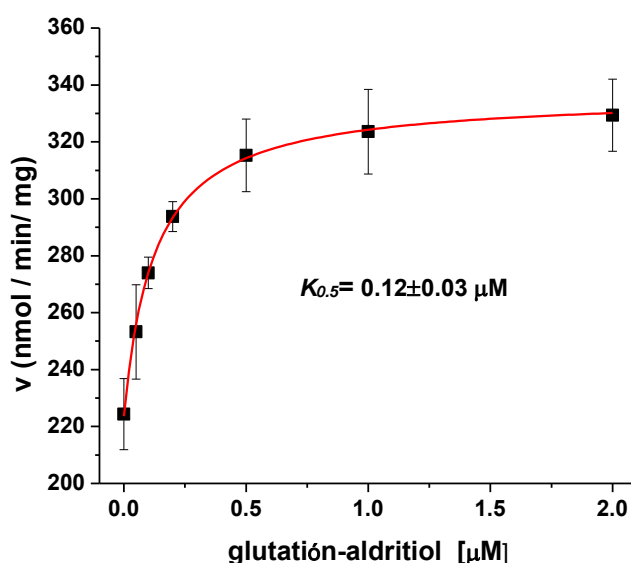


Figura 45. Activación de la ALDH1A1 por el complejo aldritol:glutatión. Se muestra el aumento de actividad en función de la concentración del complejo alcanzado la máxima activación en 2 μM.

8.2.7. Efecto del aldritol sobre la actividad de otras isoformas de aldehído deshidrogenasa.

Finalmente se analizó el efecto de este compuesto sobre la actividad de otras isoformas de ALDH humanas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 46, 47, 48 y en la tabla 5. Se observó que el compuesto actúa como un activador para las 4 isoformas de ALDH humanas ensayadas (1A1, 2, 3A1 y 5), siendo la única diferencia la concentración de aldritol necesario para alcanzar la máxima

activación, así como el porcentaje de activación para cada una de ellas. Las isoformas que mostraron una menor $K_{0.5}$ fueron ALDH2 y ALDH5A1, las cuales alcanzan el máximo de activación a 2 nM y 0.2 μ M respectivamente, mientras que las isoformas ALDH3A1 y ALDH1A1 requieren de 0.7 μ M y 1 μ M respectivamente. El porcentaje de activación es muy parecido entre las isoformas 1, 2 y 3, siendo éste de 50%, 47% y 54%, respectivamente; donde se muestra una clara diferencia es en la ALDH5A1, en la cual solo se observa un incremento de 27% en la actividad. Por otro lado, se evaluó el efecto del aldritol sobre la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH), con el fin de determinar si el efecto era específico para las ALDHs; a este respecto, se observó que la actividad de ADH es la misma en ausencia o presencia de 1 μ M del compuesto, lo cual sugiere cierta especificidad.

Figura 46. Determinación de la $K_{0.5}$ de la ALDH2 por aldritol. Se muestra el aumento de actividad en función de la concentración del aldritol alcanzando un máximo en 2 nM

Figura 47. Determinación de la $K_{0.5}$ de la ALDH3 A1 por aldritol. Se muestra el aumento de actividad en función de la concentración del aldritol alcanzando un máximo en 0.7 μ M

Figura 48. Determinación de la $K_{0.5}$ de la ALDH5 A1 por aldritol. Se muestra el aumento de actividad en función de la concentración del aldritol alcanzando un máximo en 0.2 μ M

Tabla 5. Efecto del aldritol sobre las ALDHs y ADH.

Enzima	$K_{0.5}$	V_{max} (nmol/min/mg)	V_{max}^* (nmol/min/mg)
ALDH2 [nM]	1.31 \pm 0.25	494 \pm 7	726 \pm 23
ALDH3 [μ M]	0.51 \pm 0.05	3504 \pm 55	5391 \pm 51
ALDH5 [μ M]	0.014 \pm 0.007	2053 \pm 60	2621 \pm 57
ADH	---	35982	36283

*Concentración de aldritol para cada enzima: ALDH2 (2 nM), ALDH3 (0.7 μ M), ALDH5 (0.2 μ M), ADH (1 μ M).

Figura 49. Porcentaje de activación debido al aldritol en diferentes enzimas.

9. Análisis y discusión de resultados.

El aldritol fue propuesto como activador de la ALDH1A1 por Kitson y colaboradores en 1982. Sin embargo, hasta ahora no se había realizado el análisis del efecto de este compuesto sobre las propiedades cinéticas de la ALDH1A1 y su efecto sobre otras isoformas de aldehído deshidrogenasas.

En este trabajo se determinó que el aldritol es un activador no esencial de tipo mixto de la ALDH1A1, e incrementa la actividad de la enzima en un 50% con respecto al control sin aldritol (Figura 28). Se propone que este compuesto se une a la cisteína adyacente a la catalítica, cerca del sitio de unión del aldehído, por lo que al reaccionar el aldritol con la cisteína, el anillo aromático que queda unido, disminuye el volumen del sitio activo produciendo más choques efectivos, lo que podría traducirse en una mayor actividad como ocurre con otros activadores reportados para esta enzima como el ALDA-1 (Pérez-Miller et al., 2010). Aunado a esto se ha reportado que la unión de moduladores como ALDA-1 disminuyen el pK_a del sitio activo, lo cual favorece la velocidad de catálisis, pues se incrementa la nucleofilicidad de la cisteína catalítica, este mismo efecto podría estarlo ejerciendo el aldritol (Belmont-Díaz et al., 2016), siempre y cuando el paso limitante de la reacción de esta enzima cambie de lugar o se haga menos limitante.

En cuanto a los parámetros cinéticos, se determinó que el aldritol disminuye la afinidad por el NAD^+ y el propionaldehído, pues aumenta ligeramente el valor de K_m , este hecho es más evidente para el NAD^+ (ver tabla 1). A este respecto, se puede concluir que el aldritol es un activador de tipo mixto, ya que modifica tanto el valor de K_m como la V_m , siendo más evidente el efecto sobre la velocidad máxima en donde se observó un incremento de 50%.

Previamente se mencionó la importancia de estas enzimas en el metabolismo de aldehídos altamente tóxicos, tal como acroleína, 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Es por ello, que se evaluó la capacidad catalítica de ALDH1A1 por estos aldehídos en presencia de aldritol. Como se describe en los resultados, se observó que la presencia de dicho compuesto aumenta la afinidad de la enzima por el 4-HNE y por la acroleína, mientras que no se observó ningún

cambio cuando se realizó el perfil cinético por 4-HHE (Tabla 2). Uno de los hallazgos más importantes a este respecto, es el incremento observado en la eficiencia catalítica en presencia de aldritol. Se ha descrito que la ALDH1A1 es susceptible a la inactivación por estos aldehídos (Yoval-Sánchez et al., 2012); por lo tanto, el hecho de que el aldritol incremente la velocidad de oxidación de estos compuestos, favorecería su rápida eliminación en un modelo fisiopatológico, contrarrestando los efectos tóxicos y el daño generado por la acumulación de dichos aldehídos.

A este punto no se tenía claro, que tipo de interacción se estaba generando entre la enzima y el aldritol, por lo cual, se realizó un ensayo de competencia entre disulfiram (un inhibidor de la actividad de ALDH) y el aldritol. Se ha descrito que el disulfiram (DSF) entra por el sitio de unión del aldehído y reacciona con la cisteína catalítica (Cys 302) dentro del sitio activo formando un aducto, por lo cual la enzima pierde actividad. En este experimento se esperaba que el aldritol inhibiera el efecto del DSF sobre la actividad de ALDH. Al analizar los resultados, se observó que en presencia de DSF (2 mM) se pierde el 90% de actividad de ALDH1A1 en el experimento control, mientras que al realizar el ensayo de competencia en presencia de aldritol se pierde el 70% de actividad. A pesar de que los valores de C_{50} por DSF en ausencia y presencia de aldritol sean muy parecidos, se observó un ligero efecto de protección del aldritol de la inhibición que ejerce el DSF. Estos resultados sugieren que el aldritol se une a la enzima en sitio de unión al aldehído y posiblemente su blanco de reacción sea la cisteína adyacente a la cisteína catalítica. Aunado a esto, se evaluó la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas en presencia y ausencia de aldritol. Los resultados obtenidos indicaron que dicho compuesto, protege al sitio activo de la enzima, pues la actividad de ésta se preservó al 100% a 45°C en presencia de aldritol, lo cual no ocurrió con la enzima incubada a la misma temperatura en ausencia del compuesto. A 60°C en presencia de aldritol se preservó el 50% de la actividad, mientras que el control perdió el 90% de actividad a la misma temperatura. La constante de inactivación obtenida en presencia de aldritol al realizar un análisis a través del gráfico de Arrhenius, fue 5 veces menor al compararse con su control. Estos

resultados indican que la interacción del aldritol con la enzima, le confiere una estabilidad estructural y catalítica al sitio activo.

Con el fin de dilucidar el tipo de interacción enzima-aldritol, se llevó a cabo un experimento de dilución/concentración. Para este ensayo se incubó previamente a la enzima con el aldritol (ver materiales y métodos) y posteriormente se diluyó 31 veces, para eliminar el aldritol que no hubiera reaccionado con la enzima y se concentró para evaluar la actividad remanente. Al realizar este ensayo se observó que la activación de la enzima se preserva e incluso pasa de 50% a 200% de activación a pesar de la dilución, lo cual indica que el aldritol se une fuertemente o de manera covalente a la enzima. Esta observación refuerza los datos preliminares que indican que el aldritol podría estar reaccionando con la cisteína 301 y no con la catalítica, motivo por el cual este compuesto funciona como un activador y no como un inhibidor. Diferentes isoformas de las ALDHs se han propuesto como blanco terapéutico en padecimientos asociados con altos niveles de estrés oxidante. Por lo cual, en años recientes la modulación de la expresión y actividad de estas enzimas a través de diferentes estrategias ha tomado gran relevancia. En este trabajo se demostró que el aldritol es capaz de incrementar la eficiencia catalítica de ALDH1A1 por subproductos de la lipoperoxidación.

Debido a que el aldritol es un reactivo de cisteínas, éste podría formar un complejo con el glutatión presente en el citosol (concentración alrededor de 10 mM), lo que ocasionaría que el compuesto no llegara al sitio de unión de la enzima, dadas las bajas concentraciones a las que se observa su efecto, evitando la activación.

Para evaluar el efecto del glutatión, se realizó un ensayo *in vitro* incubando glutatión con aldritol (2:1), con el fin de favorecer la reacción entre ellos. Una vez formado el complejo glutatión-aldritol, se evaluó su efecto sobre la actividad de la enzima recombinante. A este respecto, se pudo observar que el complejo glutatión-aldritol también es capaz de activar a ALDH1A1, aunque a concentraciones diferentes con respecto al aldritol por separado (figura 45). Estos datos indican que el glutatión sirve como compuesto presentador del aldritol a la enzima y una vez en el sitio activo, el aldritol reacciona con la enzima y se libera el glutatión, quedando la enzima activada.

Una vez determinado que el glutatión no interfiere con la activación de la enzima por aldritol, se realizó un experimento *in vivo* utilizando bacterias que sobre-expresaban la proteína de interés (ALDH1A1), siguiendo la curva de crecimiento a diferentes concentraciones de aldritol, en presencia de 5 mM de H₂O₂ como inductor de estrés oxidante (ver materiales y métodos). Se observó que el aldritol protegió del daño causado por H₂O₂ (figura 44), pues las células con aldritol crecieron igual que el control, mientras que en ausencia del compuesto, se observó que las células empezaron a morir desde el tiempo de la adición del H₂O₂, lo que sugiere que el compuesto está ejerciendo su función de activador y protector de la estabilidad de la ALDH. A pesar de que el glutatión puede reaccionar con el aldritol, este complejo es capaz de activar 54% a la ALDH1A1 recombinante y de esta manera contribuir a la eficiente desintoxicación de los aldehídos generados en la célula por la inducción de estrés oxidante.

Finalmente, se demostró que el aldritol es también activador de otras isoformas de ALDH, como son ALDH2, ALDH3A1 y ALDH5A1 (Figuras 46, 47, 48 y 49). La activación para cada isoforma ocurre a diferentes concentraciones de aldritol (tabla 5), lo cual se puede explicar por las características del pocket catalítico de cada isoforma. El pocket catalítico es de menor volumen para ALDH2 y ALDH5A1, que son las isoformas que requieren una menor concentración de aldritol para alcanzar el máximo de activación (2 nM y 0.2 μM respectivamente). Debido a que las concentraciones de aldritol requeridas para activar a las ALDHs son menores a 2 μM, el efecto pareciera ser específico sobre estas enzimas. Para evaluar esta propuesta se determinó el efecto del aldritol sobre la actividad de alcohol deshidrogenasa (ADH); en presencia del aldritol no se observaron cambios en la actividad de esta enzima al compararse con su respectivo control (Figura 49).

Con los resultados obtenidos se confirma que el aldritol es un compuesto capaz de activar a la ALDH1A1 y a otras enzimas pertenecientes a la familia de las ALDHs. Por lo que este compuesto podría utilizarse en un futuro en modelos patológicos donde estas enzimas tienen disminuida su actividad.

10. Conclusiones.

1. El aldritol es un activador no esencial de tipo mixto ya que modifica tanto la K_m como la V_m de ALDH1A1.
2. Este compuesto aumenta la eficiencia catalítica de la ALDH1A1 por aldehídos producto de la lipoperoxidación, logrando eliminarlos con mayor facilidad.
3. El aldritol se une de manera irreversible a la ALDH1A1.
4. El aldritol también actúa como activador de la ALDH2, la ALDH3A1 y la ALDH5 humanas.

11. Perspectivas.

1. Realizar el análisis de espectrometría de masas de la enzima ALDH1A1-aldritol para determinar la naturaleza de la unión.
2. Efectuar la caracterización cinética de la ALDH2, ALDH3A1 y ALDH5 en presencia de aldritol y determinar el efecto del complejo aldritol-glutación sobre estas enzimas.
3. Determinar el paso limitante de la reacción para las diferentes ALDHs en presencia de aldritol.
4. Evaluar la capacidad de protección del aldritol del estrés oxidante, en un modelo de células eucariontes en cultivo con la expresión endógena de las ALDHs.

12. Referencias bibliográficas.

- Bai, J., & Mei, Y. (2011). Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 attenuates neurotoxicity induced by 4-hydroxynonenal in cultured primary hippocampal neurons. *Neurotoxicity Research*, 19(3), 412–22.
- Banh, A., Xiao, N., Cao, H., Chen, C.-H., Kuo, P., Krakow, T., Le, Q.-T. (2011). A Novel Aldehyde Dehydrogenase-3 Activator Leads to Adult Salivary Stem Cell Enrichment In Vivo. *Clinical Cancer Research*, 17(23), 7265–7272.
- Belmont-Díaz, J. a, Calleja-Castañeda, L. F., Yoval-Sánchez, B., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2015). Tamoxifen, an anticancer drug, is an activator of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*, 83(1), 105–16.
- Belmont-Díaz, J. A., Yoval-Sánchez, B., Calleja-Castañeda, L. F., Pardo Vázquez, J. P., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2016). Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *The FEBS Journal*, 283(19), 3637–3650.
- Brocker, C., Lassen, N., Estey, T., Pappa, A., Cantore, M., Orlova, V. V, Vasiliou, V. (2010). Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18452–63.
- Cardellá, L. R. (2013). *Bioquímica Médica*. Tomo I. 2da Edición. Cuba Ciencias médicas.
- Chen, C.-H., Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M.-H., Hurley, T. D., & Mochly-Rosen, D. (2008). Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science*, 321(5895), 1493–1495.
- Chen, C.-H., Ferreira, J. C. B., Gross, E. R., & Mochly-Rosen, D. (2014). Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities. *Physiological Reviews*, 94(1), 1–34.
- Copeland, A. R. (2000). *Enzymes a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2nd ed.). New York. Wiley-VCH

- De Master, E. G., Redfern, B., & Nagasawa, H. T. (1998). Mechanisms of inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitroxyl, the active metabolite of the alcohol deterrent agent cyanamide. *Biochemical Pharmacology*, 55(12), 2007–15.
- Dolores, M., & Arrieta, E. (2000). Mecanismos implicados en las conductas inducidas por el alcohol: el papel de los enzimas cerebrales responsables del metabolismo del acetaldehído. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias humanas y sociales universidad de Jaén.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128.
- Fieser, L. F., Fieser, M., & Crespo Cereceda, R. (1985). *Química orgánica fundamental*. Reverté.
- Grünblatt, E., & Riederer, P. (2016). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 123(2), 83–90.
- Hempel, J., Bahr-Lindstrom, H. and Jornvall, H., (1984) Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. 141, 21-35.
- Hempel, J., Perozich, J., Chapman, T., Rose, J., Boesch, J. S., Liu, Z. J., Wang, B. C. (1999). Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. A proposal. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 463, 53–9.
- Kazmi, S. M., Li, D., Koop, K., Conant, J., & Lau, C. Y. (1992). Role of aldehyde dehydrogenase in the biological activity of sperminedialdehyde, a novel immunosuppressive/purginagent. *Pharmacological Research*, 25(4), 383–92.
- Kitson, T. M. (1982). The activation of aldehyde dehydrogenase by diethylstilboestrol and 2, 2'-dithiodipyridine. *Biochemical Journal*, 207, 81–89.

- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., Vasiliou, V. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520–539.
- Kwon, H.-J., Won, Y.-S., Park, O., Chang, B., Duryee, M. J., Thiele, G. E., Gao, B. (2014). Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology*, 60(1), 146–157.
- Lassen, N.; Bateman, B. B.; Estey, T.; Kuszak, J.R.; Nees, D.W.; Piatigorsky, J.; Duester, G.; Day, B.J.; Huang, J.; Hines, L.M. and Vasiliou, V. (2007) Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1. Cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1 (-/-)/ Aldh1a1 (-/-)* knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 282, 25668-25676.
- Li, Y., Liu, S., & Qi, S. (2018). ALDH2 Protects Against Ischemic Stroke in Rats by Facilitating 4-HNE Clearance and AQP4 Down-Regulation. *Neurochemical Research*, 43(7), 1339–1347.
- Lindahl, R.; (1992) Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27:283–335.
- Lipsky, J. J., Shen, M. L., & Naylor, S. (2001). Overview-in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chemico-Biological Interactions*, 130–132(1–3), 81–91.
- Lowe, E. D., Gao, G.-Y., Johnson, L. N., & Keung, W. M. (2008). Structure of Daidzin, a Naturally Occurring Anti-Alcohol-Addiction Agent, in Complex with Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(15), 4482–4487.
- Mckee, T. y Mac Kee, J. R. (2014). *Bioquímica: las bases moleculares de la vida*. 5ª edición. Mexico. McGraw-Hill Education.

- Min, H., Shane, B., & Stokstad, E. L. (1988). Identification of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase-hydrolase as a major folate binding protein in livercytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 967(3), 348–53.
- Moore, S. A.; Baker, H. M.; Blythe, T. J.; Kitson, K, E.; Kitson, T. M. and Baker, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6:1541-1551.
- Nelson, D. L y Cox, M. M. (2015). *Lehninger: Principios De Bioquímica*. 5ª edición. México. Omega
- Ni, L., Sheikh, S., Weiner, H. (1997). Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human livermitochondrial aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18823–6.
- Patel, M., Lu, L., Zander, D.S., Sreerama, L., Coco, D. and Moreb, J.S. (2008) ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: Correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer*. 59, 340-349.
- Perez-Miller, S., Younus, H., Vanam, R., Chen, C.-H., Mochly-Rosen, D., & Hurley, T. D. (2010). Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 159–64.
- Piatigorsky, J. (2001). Enigma of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea: the refracton hypothesis. *Cornea*, 20(8), 853–8.
- Picklo, M. J., Olson, S. J., Markesbery, W. R. and Montine, T. J. (2001) Expression and activities of aldo-keto oxidoreductases in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurology*. 60(7): 686-695.
- Rodriguez-Zavala, J. S., & Weiner, H. (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry*, 41(26), 8229–37.

- Sládek, N. E. (2003). Human aldehyde dehydrogenases: Potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 7–23.
- Stagos, D., Chen, Y., Cantore, M., Jester, J. V., & Vasiliou, V. (2010). Corneal aldehyde dehydrogenases: multiple functions and novel nuclear localization. *Brain Research Bulletin*, 81(2–3), 211–8.
- Sydow, K., Daiber, A., Oelze, M., Chen, Z., August, M., Wendt, M., Münzel, T. (2004). Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 482–9.
- Uma, L., Hariharan, J., Sharma, Y., & Balasubramanian, D. (1996). Corneal aldehyde dehydrogenase displays antioxidant properties. *Experimental Eye Research*, 63(1), 117–20.
- Vasiliou, V., & Nebert, D. W. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics*, 2(2), 138.
- Vasiliou, V., Pappa, A., & Petersen, D. R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 129(1–2), 1–19.
- Vasiliou, V., Pappa, A., & Estey, T. (2004). Role of Human Aldehyde Dehydrogenases in Endobiotic and Xenobiotic Metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 36(2), 279–299.
- Wang, M.-F., Han, C.-L., & Yin, S.-J. (2009). Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), 36–39.
- Yoval-Sánchez, B., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2012). Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts. *Chemical Research in Toxicology*, 25(3), 722–729.

Zhai Y. Sperkova Z. and Napoli, J. L. (2001) Cellular expression of retinaldehydehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. *Journal of Cell Physiology* 186, 220-232.

13. Anexo A: Medios y Reactivos utilizados.

Medio LB

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H₂O	c.b.p 1 L

Medio 2XYT

Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
H₂O	c.b.p 1 L

Amortiguador de fosfatos

NaH₂PO₄	50 mM
Na₂HPO₄	50 mM
H₂O	c.b.p 1 L

Amortiguador A para la columna de IMAC

NaH₂PO₄	50 mM
NaCl	500 mM
β-ME	1.43 mM
H₂O	c.b.p 1 L
pH	7.5

Amortiguador B para la columna de IMAC

NaH₂PO₄	50 mM
NaCl	500 mM
β-ME	1.43 mM
H₂O	c.b.p 1 L
Imidazol	500 mM
pH	7.5

Reactivo A para deteminacion de proteína

Ácido bicinconínico	0.1 g
Na₂CO₃	2.0 g
Tartrato de sodio	0.16 g
NaOH	0.4 g
NaHCO₃	0.95 g
H₂O	c.b.p 100 mL
pH	11.25

Reactivo B para deteminacion de proteína

CuSO₄	0.4 g
H₂O	c.b.p. 10 mL

Componentes del gel de poliacrilamida-SDS

	Separador	Concentrador
Acilamida 30%	2.5 mL	415μL
Buffer	1.69 mL Tris 2M pH 8.8	250μL Tris 1M pH 6.8
SDS 10%	75μL	25μL
TEMED	3.8μL	1.75μL
APS 10%	38μL	17.5μL
H₂O	c.b.p. 7.5 mL	c.b.p. 2.5 mL

**Amortiguador de
corrida del gel de
poliacrilamida-SDS**

Tris-HCl	0.025 M
Glicina	0.192 M
SDS	0.1 %
H₂O	c.b.p. 1 L

**Amortiguador de carga del gel de
poliacrilamida-SDS**

Tris- HCl pH 6.8	100 mM
SDS	4% m/v
Azul de bromofenol	0.2% m/v
Glicerol	20% v/v
β-ME	200 mM

**Solución de Coomassie para tinción de los geles de
poliacrilamida-SDS**

Metanol	500 mL
H₂O	400 mL
Ácido acético	100 mL
Coomassie azul brillante R- 250	0.25 g