



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ACTIVACIÓN DE LA ALDH1A1 POR OMEPRAZOL Y PROTECCIÓN CELULAR
DEL ESTRÉS OXIDANTE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. LUIS FRANCISCO CALLEJA CASTAÑEDA

TUTOR: DR. JOSÉ SALUD RODRÍGUEZ ZAVALA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Activación de la ALDH1A1 por omeprazol y protección celular del estrés oxidante, que presenté para obtener el grado de Doctorado es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Luis Francisco Calleja Castañeda, No. de Cuenta 305267658

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. José Salud Rodríguez Zavala en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

Agradezco al comité tutor por todas las observaciones y comentarios realizados para el desarrollo de este proyecto, dicho comité se encontraba integrado por:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM

Dr. José de Jesús García Trejo Facultad de Química, UNAM

Dr. José Salud Rodríguez Zavala Instituto Nacional de Cardiología

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 446087 y por el financiamiento otorgado mediante el donativo No. 166463 para la realización de este trabajo. También, se agradece al programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP), por el financiamiento otorgado para asistir al 31st Annual symposium of the Protein society en Montreal, Canadá; y al 22nd International conference on oxidative stress reduction, redox homeostasis and antioxidants en París, Francia.

Finalmente agradezco al jurado, por sus observaciones y comentarios.

Dra. Adela Rodríguez Romero Instituto de Química, UNAM

Dr. Daniel Alejandro Fernández de Velasco Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres Facultad de Química, UNAM

Dra. Marina Gavilanes Ruiz Facultad de Química, UNAM

Dr. Horacio Reyes Vivas Instituto Nacional de Pediatría

Con cariño y amor para
David Mandaluniz y
Belem Yoval

Resumen

Las aldehído deshidrogenasas (ALDH) se encargan de la desintoxicación de los aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica, por lo que son importantes en el manejo del estrés oxidante en la célula. Los aldehídos tienen una vida media mayor a la de los radicales libres, por lo que, tras reaccionar en su sitio de origen, difunden a sitios lejanos, causando daño. Debido a su relevancia fisiológica, es importante diseñar estrategias con el fin de modular su actividad. Un escrutinio de activadores potenciales de las ALDH, seleccionó al omeprazol como un buen candidato dadas sus características estructurales. Mediante un análisis de acoplamiento del omeprazol en el sitio activo de las ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1, proponemos que este compuesto presenta mayor afinidad para ALDH1A1. Al evaluar el efecto del omeprazol sobre la actividad de estas enzimas, observamos un aumento de 4 veces de la ALDH1A1 respecto a la enzima sin modulador, mientras el omeprazol protegió a la ALDH2 de la inactivación por aldehídos lipídicos sin modificar su actividad. En un modelo *in vitro* de células eucariotas en presencia de H₂O₂, el omeprazol elevó a más del 90% la viabilidad celular y la función mitocondrial (respiración mitocondrial y formación de potencial electroquímico transmembranal), las actividades de la ALDH y de la aconitasa (enzima marcadora de daño por estrés oxidante) no se modificaron, y los niveles de aldehídos lipídicos se mantuvieron semejantes a la condición control (sin H₂O₂, ni omeprazol). En células expuestas a H₂O₂, la viabilidad celular y la función mitocondrial disminuyeron significativamente, al igual que la actividad de la ALDH y la aconitasa, mientras que los niveles de aldehídos lipídicos aumentaron. En conclusión, el omeprazol protege a la célula del daño generado por la adición del H₂O₂, manteniendo bajos los niveles de aldehídos lipídicos en la célula, mediante la protección de ALDH1A1 y ALDH2 de la inactivación por estos aldehídos. Lo anterior sugiere que las ALDH son un componente muy importante del sistema antioxidante, ya que al abatir la actividad de estas enzimas se afecta fuertemente la viabilidad de las células.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1. Estrés oxidativo	1
Especies reactivas del oxígeno	1
Sistema antioxidante	2
Glutación	4
Glutación-S-transferasa	4
Peroxidación lipídica	5
Estructura y distribución de los aldehídos	7
Etiología y patogénesis de los aldehídos lipídicos	9
Capítulo 2. Aldehído deshidrogenasas	10
Estructura y función de las aldehído deshidrogenasas	10
Mecanismo cinético de reacción de las aldehído deshidrogenasas	11
Etapas limitantes de ALDHs	12
Capítulo 3. Activadores de las aldehído deshidrogenasas	14
Moduladores que incrementan la actividad de aldehído deshidrogenasas	14
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
Materiales y métodos	17

Expresión y purificación de la proteína recombinante	17
Cuantificación de la proteína	17
Análisis cinético	19
Caracterización cinética	19
Protocolo de activación de las ALDHs por omeprazol	19
Determinación del paso limitante	20
Ensayo de inactivación enzimática	21
Análisis de la estabilidad de la proteína	21
Desnaturalización de la proteína por temperatura	21
Desnaturalización de la proteína por cloruro de guanidina	21
Evaluación de la naturaleza de la unión del omeprazol a la proteína	22
Análisis de espectrometría de masas	22
Ensayo de competencia con p-nitrofenilacetato	22
Ensayo de la protección celular del estrés oxidante generado por H ₂ O ₂	23
Ensayo de protección con células de <i>E. Coli</i> BL21	23
Aislamiento de células AS30D y ensayo de protección por omeprazol	24
Determinación de la actividad enzimática	25
Determinación de la actividad de aconitasa	25
Determinación de la actividad de superóxido dismutasa	25
Determinación de la actividad de catalasa	25
Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa	26

Determinación de la actividad de glutatión S-transferasa	26
Determinación de la actividad de aldehído deshidrogenasa	26
Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa	27
Determinación de los productos de la peroxidación lipídica	27
Aislamiento de mitocondrias de células AS30D	27
Evaluación de la respiración mitocondrial	28
Determinación de la formación de potencial electroquímico mitocondrial	28
Resultados y Discusión	29
Análisis de docking de ALDH con omeprazol	29
Naturaleza de la unión al omeprazol	34
Protección de las células bacterianas del estrés oxidativo por omeprazol	39
Efecto del omeprazol sobre la viabilidad de hepatocitos aislados y células AS30D expuestas a estrés	43
Actividad de enzimas antioxidantes	47
Niveles de especies reactivas de oxígeno en células AS30D	51
Protección de hepatocitos aislados del estrés oxidante	53
Evaluación de la función mitocondrial	58
Conclusión	66
Publicaciones derivadas del proyecto de investigación	67
Referencias bibliográficas	69

Abreviaturas

ALDA-1	N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALDH1A1	Aldehído deshidrogenasa clase 1A1
ALDH2	Aldehído deshidrogenasa clase 2
ALDH3A1	Aldehído deshidrogenasa clase 3A1
BCA	Ácido biciconínico
BSA	Albumina de suero bovino
GPx	Glutatión peroxidasa
GR	Glutatión reductasa
4-HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
LPO	Peroxidación lipídica
LPP	Productos de la peroxidación lipídica
MDA	Malondialdehído
NAD ⁺	Nicotinamida adenina nucleótido (Oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina nucleótido (Reducida)
PDB	Banco de datos de proteínas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa

Introducción

Capítulo 1. Estrés oxidativo

Especies reactivas del oxígeno

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad antioxidante de la célula. Cuando la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante se produce estrés oxidativo y daño celular (Canakci *et al.*, 2009). El daño oxidante puede ocurrir por aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS) debido a que se encuentran en una concentración elevada y no alcanzan el último paso en la reducción del oxígeno, el agua, produciendo la oxidación de macromoléculas tales como proteínas, carbohidratos y lípidos (Canakci *et al.*, 2009; Benítez-Sillero *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2006). Se ha asociado al estrés oxidante con diferentes enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y del síndrome metabólico tales como diabetes e hipertensión (Martínez *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2011). Se considera al estrés oxidante como parte de la fisiopatología de muchas enfermedades y se sugiere que los agentes que lo disminuyen pueden desempeñar un papel importante en su tratamiento (Martínez *et al.*, 2006).

Las EROS son moléculas pequeñas formadas como subproducto del metabolismo del oxígeno, sin embargo, son altamente reactivas debido a que poseen una capa de electrones de valencia no apareada. Cuando la concentración de estas EROS tales como OH^\bullet o H_2O_2 , se elevan en la célula debido a un estrés, desencadenan procesos como la peroxidación lipídica en donde las EROS como el radical hidroxilo (OH^\bullet) o el radical hidropéroxilo ($^\bullet\text{HO}_2$) atacan átomos de carbono adyacentes a los dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados que tienen grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) y cuyos hidrógenos son especialmente reactivos, el electrón libre se transfiere al lípido formando un lípido radical y agua (Tappel *et al.*, 1953). Las EROS menos reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no son capaces de iniciar esta reacción (Blake *et al.*, 1987), sin embargo mediante la

reacción de Fenton dentro de la célula, esta especie se oxida al radical hidroxilo que inicia otro ciclo de oxidación (Wardman *et al.*, 1996).

Sistema antioxidante

Existen diversos sistemas antioxidantes, algunos de los cuales están presentes en la dieta y contribuyen a la protección del organismo ante agentes o elementos extraños que ocasionan daños a nivel celular (Battino *et al.*, 2002; Greabu *et al.*, 2008). De acuerdo con Battino *et al.*, 2002, los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en 3 grupos: el primero, de antioxidantes preventivos que suprimen la formación de radicales libres, incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, carotenoides, transferrina y albúmina. El segundo, que se encarga de secuestrar radicales libres y eliminarlos, está conformado por el ácido úrico, bilirrubina, vitaminas A, C y E. El tercer grupo, que repara el daño ocasionado por los radicales libres en el entorno de la membrana celular, lo conforman enzimas de reparación de ácido desoxirribonucleico (DNA), lipasas, proteasas y transferasas (Battino *et al.*, 2002; Greabu *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2003).

Dentro de las enzimas antioxidantes podemos encontrar a la SOD. Esta enzima cataliza la reacción que inactiva al radical libre superóxido transformándolo en una especie menos reactiva, el H_2O_2 . Este grupo de enzimas tienen grupos metálicos en su centro activo, y se diferencian por el metal que tienen en su grupo prostético: Cu/Zn, Ni, Fe o Mn. Posteriormente, la catalasa (CAT) es la enzima que cataliza la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua. El H_2O_2 también puede ser tomado por la glutatión peroxidasa (GPx) que cataliza la reacción de oxidación de glutatión (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) y agua (Figura 1). Por otro lado, mediante la reacción de Fenton se generan radicales hidroxilo cuyo potencial de oxidación es muy elevado, la generación de estos radicales tiene lugar cuando se combina el H_2O_2 con metales de transición, generalmente hierro, estos radicales desencadenan

un proceso denominado peroxidación lipídica cuyos productos finales son aldehídos altamente tóxicos (Figura 1).

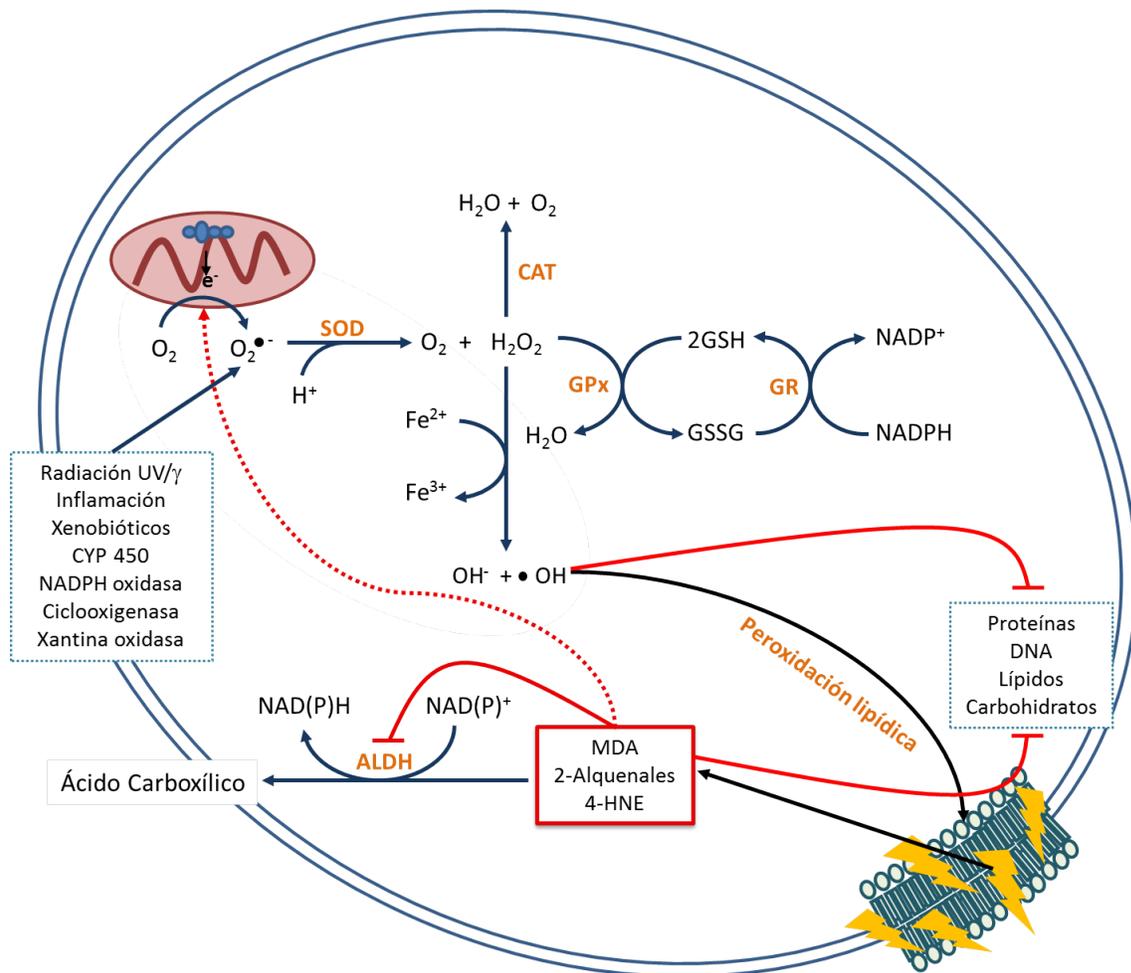


Figura 1. Sistema antioxidante. Las enzimas antioxidantes de la célula eliminan las EROS. Sin embargo, la reacción de Fenton puede producir radicales libres que desencadenan la peroxidación lipídica generando aldehídos tóxicos. Estos compuestos inactivan proteínas y aumentan la producción de EROS magnificando el daño oxidativo en la célula. Finalmente, las ALDH desintoxican estos aldehídos protegiendo a la célula.

Glutati3n

El glutati3n (GSH) es un trip3ptido de bajo peso molecular formado por los amino3cidos: 3cido glut3mico, glicina y ciste3na: es un antioxidante que participa en la reducci3n de EROS e inactivaci3n de xenobi3ticos, funciona como coenzima, interviene en el proceso de apoptosis y s3ntesis de prote3nas, adem3s de regular la formaci3n y mantenimiento de la forma activa de ciertas enzimas (Mart3nez *et al.*, 2006; Lu, 1999; Lu, 2013). El glutati3n puede encontrarse como GSH en su forma reducida (tiol libre) o como glutati3n disulfuro (GSSG) en su forma oxidada, formando un puente disulfuro. El GSSG es reducido a trav3s de la glutati3n reductasa, siendo as3 el GSH la especie predominante en la c3lula en condiciones fisiol3gicas (Lu, 2013). Las caracter3sticas nucleof3licas del GSH aportadas por su grupo tiol libre le permiten reducir diversos compuestos con caracter3sticas electrof3licas como pueden ser los per3xidos y disulfuros al donar un prot3n y lograr la ruptura de diversos enlaces, prote3nas, factores de transcripci3n y mol3culas previamente oxidadas (Sheehan *et al.*, 2001; Lu, 2013; Noctor *et al.*, 2012; Deponte, 2013).

Glutati3n S-transferasa

La glutati3n S-transferasa (GST) es una enzima dim3rica responsable de la biotransformaci3n de distintos compuestos electrof3licos mediante procesos de conjugaci3n (Dirr *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2011). Adem3s de estas reacciones, la GST efectúa reacciones de reducci3n e isomerizaci3n, interviene en la bios3ntesis de prostaglandinas y esteroides, catabolismo de tirosina y la apoptosis celular, entre otras funciones (Wu *et al.*, 2012). Las GST humanas tienen 3 familias: citos3licas, mitocondriales y membranales asociadas al metabolismo del GSH (Wu *et al.*, 2012).

Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LPO) se define como el deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados (Tappel *et al.*, 1953). Durante este proceso los radicales libres capturan electrones de los lípidos de las membranas celulares y está dado por tres fases, la iniciación, propagación y la fase de terminación (Figura 2). Durante la fase de iniciación, las especies reactivas del oxígeno (EROS) como el radical hidroxilo (OH^\bullet) o el radical hidropéroxilo ($^\bullet\text{HO}_2$) atacan átomos de carbono adyacentes a los dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, que tienen grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) y cuyos hidrógenos son especialmente reactivos, el electrón libre se transfiere al lípido formando un lípido radical y agua. Las EROS menos reactivos como H_2O_2 no son capaces de iniciar esta reacción (Blake *et al.*, 1987). El radical lipídico generado durante la fase de iniciación no es una molécula estable, por lo que comienza una deslocalización del electrón libre por resonancia. Sin embargo, este radical lipídico continúa siendo una molécula inestable, capaz de reaccionar espontáneamente con oxígeno molecular para formar un radical peroxil lipídico, igualmente inestable.

En la fase de propagación, el radical peroxil lipídico reacciona con otro ácido graso vecino, produciendo otro radical de ácido graso, el cual, a su vez, reacciona con el oxígeno molecular para formar otro peróxido lipídico. Este mecanismo se denomina, reacción en cadena de radicales. El nivel de daño producido por varias moléculas radicales durante la peroxidación lipídica es alto, ya que pueden oxidar aproximadamente el 50% de ácidos grasos insaturados presentes en la membrana plasmática (Kothari *et al.*, 2010).

La propagación de la peroxidación lipídica llega a su fin cuando un radical peroxil lipídico reacciona con otro radical, produciendo un producto estable, al formar un enlace covalente. Esta fase de terminación, comienza cuando existe una alta concentración de radicales lipídicos, de modo que la probabilidad de que dos radicales puedan reaccionar es alta.

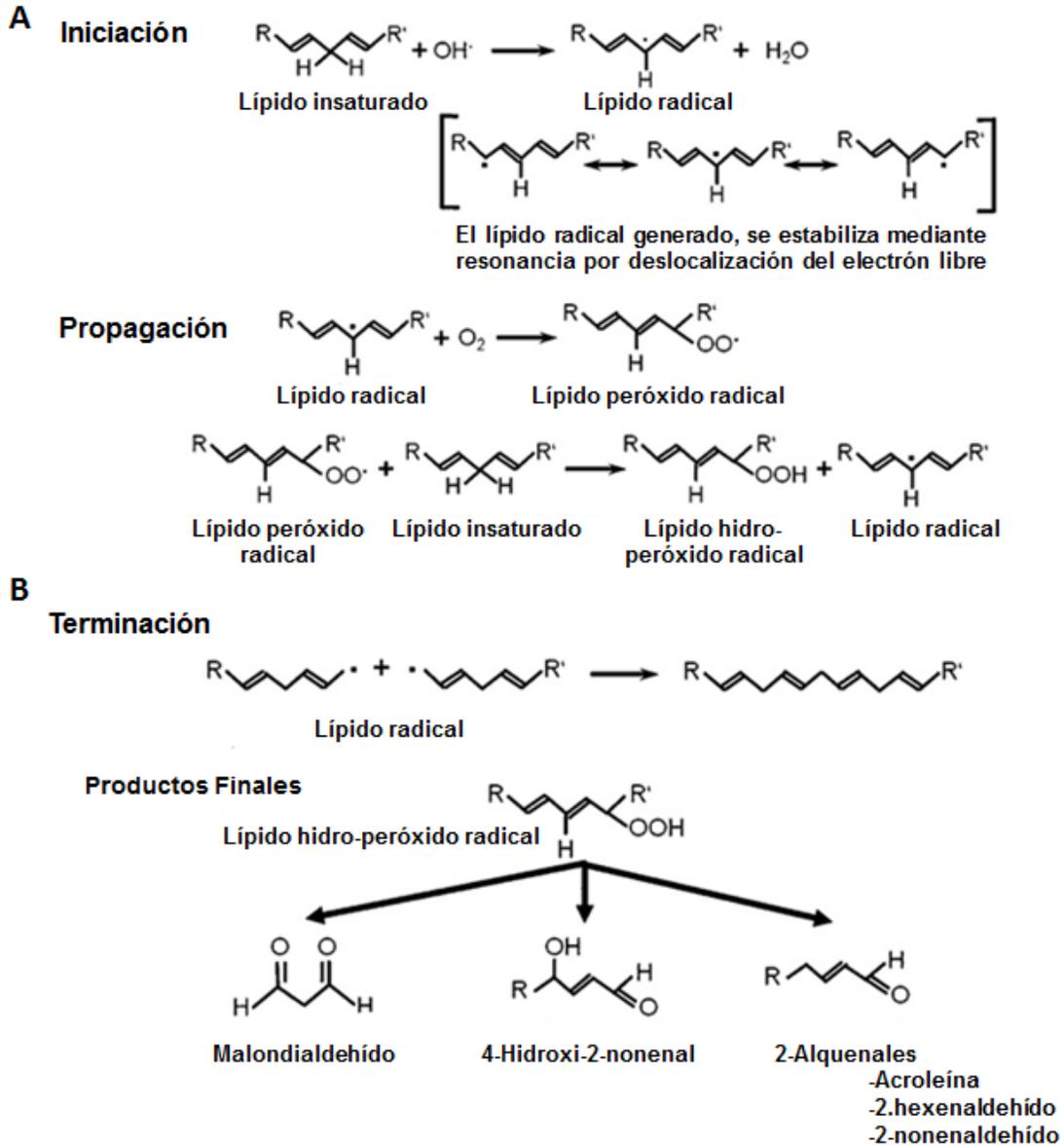


Figura 2. Peroxidación lipídica. (a) Fase de iniciación y propagación por radicales. En la fase inicial, el radical lipídico se estabiliza en diferentes estructuras de resonancia por deslocalización de los electrones libres. En la fase de propagación, los radicales lipídicos reaccionan con oxígeno molecular para formar un radical peróxido lipídico que se propaga por medio de una reacción en cadena de radicales. (b) En la fase de terminación, dos radicales de lípidos reaccionan entre sí para formar un enlace estable. Además, de los radicales hidroperoxilo de

lípidos, se forma una variedad de productos de degradación como malondialdehído, 4-hidroxi-2-alquenes y 2-alquenes.

Estructura y distribución de los aldehídos

Los aldehídos son compuestos orgánicos que contienen un grupo carbonilo al final de una cadena de carbonos, este grupo carbonilo proporciona a la molécula la propiedad de formar un dipolo y generar un centro electrofílico, el cual favorece su elevada inestabilidad y reactividad. Dentro de este grupo de compuestos carbonílicos se encuentran: 1) aldehídos saturados, como acetaldehído, propionaldehído, hexanaldehído y nonilaldehído; 2) alquenes insaturados, como la acroleína, 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), 4-hidroxi-2-hexenal, 2-hexenal y 2-nonenal; 3) aldehídos aromáticos, como benzaldehído y 3,4-dihidroxifenilacetaldéhído (DOPAL), y 4) aldehídos dicarbonílicos como el glioxal y el malondialdehído (MDA) (McMurry, 2005) (Figura 3).

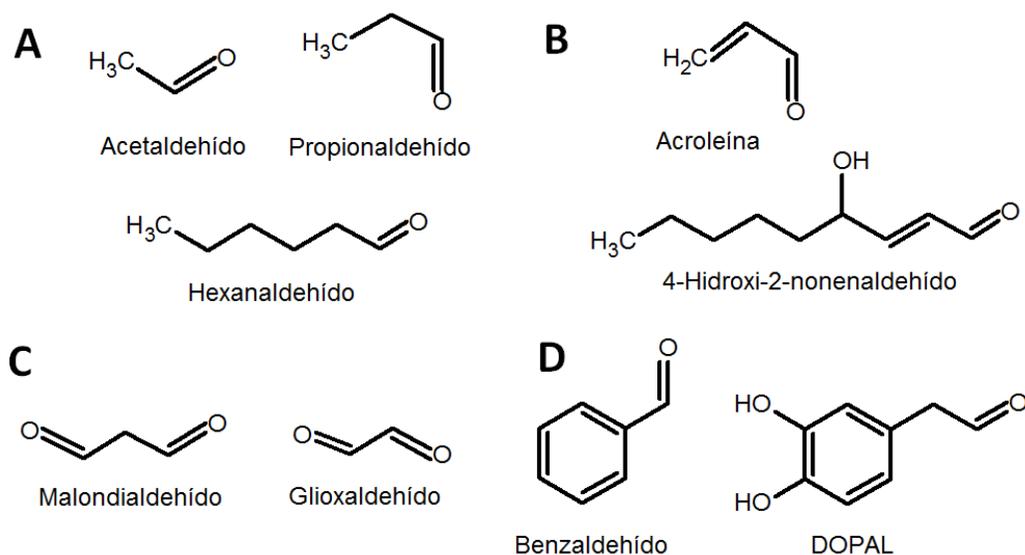


Figura 3. Estructura de los aldehídos. (A), aldehídos saturados; (B), aldehídos insaturados; (C), aldehídos dicarbonílicos; (D), aldehídos aromáticos.

Los aldehídos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son generados durante numerosos procesos biológicos e industriales. En fábricas y

vehículos son un producto secundario que proviene principalmente de la combustión incompleta de hidrocarburos, pero también se encuentran en el humo de cigarrillos, de la madera y aceites quemados (OMS, 1999). Por otro lado, una gran variedad de aldehídos alifáticos tales como acetaldehído y citraldehído, y aromáticos como el benzaldehído, existen de manera natural en alimentos, particularmente en las frutas y en semillas oleaginosas, a las cuales proporcionan diferentes aromas y sabores (Friedman *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2014).

Fisiológicamente, los aldehídos son generados a partir de una amplia variedad de precursores endógenos y exógenos; algunos son importantes reguladores cotranscripcionales que pueden participar como mensajeros en cascadas de señalización durante varios procesos biológicos. Tal es el caso del retinaldehído que mediante su oxidación forma ácido retinoico, el cual juega un papel importante durante la embriogénesis en el crecimiento y desarrollo del feto (Duester, 2000). Otros aldehídos que participan en procesos de regulación celular, son los producidos durante la peroxidación lipídica (alquenas insaturados), cuyo efecto está determinado por la concentración. Por ejemplo, el 4-HNE y la acroleína, a bajas concentraciones inducen la apoptosis mediada por la activación de caspasas y la muerte mitocondrial (Burcham *et al.*, 2001; Tanel *et al.*, 2007), mientras que a concentraciones más elevadas, estos compuestos generan muerte celular por necrosis. Se ha descrito que la acroleína es un compuesto que está clasificado en el grupo 2A, según la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC), como un probable carcinógeno para los seres humanos; sin embargo, todavía no se cuenta con la información completa al respecto. Esta categoría se usa cuando hay evidencia limitada del efecto carcinógeno en humanos y suficiente evidencia de efecto carcinógeno en animales de experimentación (IARC, 2006; Cheng *et al.*, 2001). Los alquenas insaturados representan el grupo de aldehídos más reactivos, ya que contienen dos centros electrofílicos generados por la resonancia de los electrones en la molécula. Se ha sugerido que estos aldehídos reaccionan de manera primaria con el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el grupo α -amino de la lisina y el grupo imidazol de la

histidina en las proteínas, a través de la formación de una base de Schiff o de una reacción de adición de Michael (Chavez *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2005).

Etiología y patogénesis de los aldehídos lipídicos

Los productos de la peroxidación lipídica, tales como malondialdehído, acroleína y 4-hidroxi-2-nonenal, se han relacionado con diferentes etiologías en las que se genera un aumento en los niveles de estrés oxidante. El mecanismo por el cual estos compuestos son altamente tóxicos se debe a su capacidad de formar aductos con proteínas y DNA, ejerciendo tanto citotoxicidad como genotoxicidad (Papazafropoulou *et al.*, 2011). En estudios previos, se ha descrito que los productos de la peroxidación reaccionan preferentemente con aminoácidos nucleofílicos, en el siguiente orden de preferencia: Cisteína > Histidina > Lisina, inactivando diversas enzimas y evitando que cumplan con su función en el organismo (Chávez *et al.*, 2011). Por otra parte, se sabe que algunos aldehídos como el 4-HNE y el malondialdehído reaccionan con la desoxiadenosina y desoxiguanosina del DNA formando aductos (Kaneko *et al.*, 2001). A diferencia de los radicales libres, los aldehídos tienen una vida media relativamente larga y debido a ello no solo reaccionan en el sitio donde se generan, también pueden difundir a sitios lejanos de donde fueron generados (Esterbauer *et al.*, 1991).

La acroleína es el producto de la peroxidación lipídica más tóxico para el organismo, ya que es altamente reactivo y forma una mayor cantidad de aductos con proteínas comparado con el MDA y 4-HNE (Chávez *et al.*, 2011). La alta reactividad de este compuesto se debe a la insaturación α/β presente en su cadena. Este compuesto, además de ser un subproducto de la peroxidación lipídica, también es un contaminante ambiental generado a partir de la combustión incompleta de hidrocarburos (Ratcliff *et al.*, 2010).

Capítulo 2. Aldehído Deshidrogenasas

Estructura y función de las aldehído deshidrogenasas

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son una superfamilia de enzimas que se encargan de la oxidación de los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, mediante la reducción de NAD(P)^+ . En el humano se han reportado 20 genes que codifican para diferentes isoformas de ALDHs, las cuales presentan un estado de oligomerización de dímero o de tetramero. Por ejemplo, ALDH1A1 y ALDH2 son tetrameros que comparten más de 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos, mientras que ALDH3A1 es una enzima dimérica que comparte aproximadamente un 30% de identidad con las isoformas tetraméricas (Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1999). Si se superpone la estructura dimérica en la tetramérica, se puede observar que el tetramero es un dímero de dímeros (Figura 4).

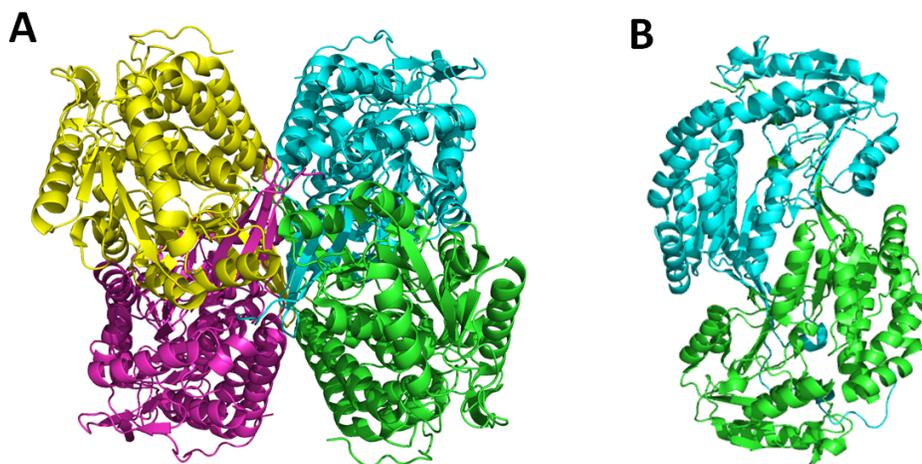


Figura 4. Diagrama de listón de la estructura cuaternaria presente en las diferentes isoformas de las ALDHs. (A), Tetramero de la ALDH2 humana (código PDB; 3N80); (B), Dímero de la ALDH3A1 humana (código PDB; 3SZA).

En cuanto a la especificidad por sustratos, la ALDH1A1 utiliza aldehídos alifáticos de cadena corta mediana y larga, así como aldehídos aromáticos. La ALDH2 actúa con alta afinidad sobre aldehídos alifáticos de cadena corta, tales como el acetaldehído y propionaldehído (Klyosov *et al.*, 1996), mientras que la ALDH3A1

actúa preferentemente sobre aldehídos aromáticos y aldehídos alifáticos de cadena larga (Pappa *et al.*, 2003). El diámetro del embudo de entrada al sitio de unión del aldehído varía para cada isoforma, de tal modo que el diámetro para ALDH1A1 y ALDH2 es menor respecto al de ALDH3A1; de esta forma, se reduce el impedimento estérico y esto permite que aldehídos aromáticos o de cadena muy larga puedan entrar al sitio activo de esta isoforma; aunado a esto, la cantidad de aminoácidos hidrofílicos expuestos en el sitio de unión del aldehído es menor en ALDH3A1 (Belmont-Díaz *et al.*, 2015). Es quizá por estas diferencias estructurales que la preferencia por las diferentes clases de aldehídos varía para cada isoforma.

Mecanismo cinético de reacción de las aldehído deshidrogenasas

El mecanismo de reacción de estas enzimas es BiBi secuencial ordenado (Figura 5), lo cual indica que los sustratos entran y salen en un orden estricto. En un primer paso, la coenzima oxidada (NAD^+) se une a la enzima libre, lo que genera un cambio conformacional que se refleja en la disminución del pK_a en el residuo de cisteína catalítico (C243 en ALDH3A1; C302 en ALDH1A1 y ALDH2; Marchal *et al.*, 1999). De este modo, la forma ionizada del grupo sulfhidrilo reacciona con el aldehído generando un intermediario tiohemiacetal. El siguiente paso de la reacción es la transferencia de un hidruro, el cual se da del intermediario tiohemiacetal al NAD^+ que se reduce a NADH, en este paso se forma un intermediario tioéster. Después de la transferencia del hidruro, cambia la rotación de los enlaces del grupo pirofosfato del NADH cambiando la posición del anillo de nicotinamida (MacGibbon *et al.*, 1977), lo cual favorece la conformación de salida de la coenzima reducida. Finalmente, un ion hidroxilo que es producto de la desprotonación de una molécula de agua por la base general (E333 en ALDH3A1 y E268 en ALDH1A1 y ALDH2; Wang *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 1999), realiza un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del intermediario tioéster. De este modo, se genera el acilo que es el primer producto liberado por la enzima y por último, es liberada la coenzima reducida (NADH), que es el segundo producto.

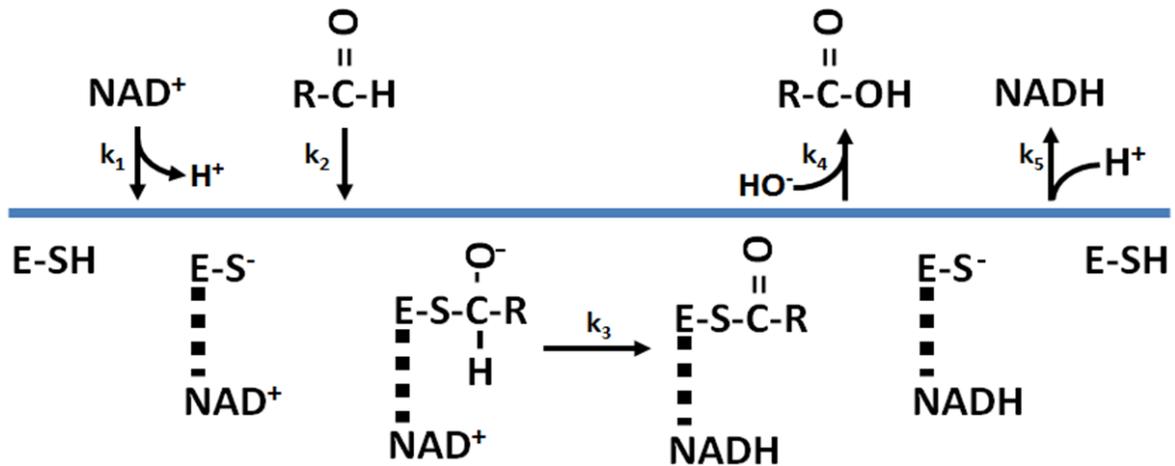


Figura 5. Mecanismo cinético general de reacción BiBi secuencial ordenado, para la oxidación de aldehídos por las ALDHs k_1 , unión de la coenzima oxidada; k_2 , unión del aldehído; k_3 , transferencia del hidruro; k_4 , liberación del acilo; k_5 , liberación de la coenzima reducida. k , representa la constante de velocidad para cada uno de los pasos involucrados en la catálisis (Modificado de Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006).

Etapas limitantes en ALDHs

A pesar de que todas las isoformas de ALDH presentan el mismo mecanismo cinético, cada una difiere en su paso limitante. El paso limitante para la ALDH1A1 es la disociación o liberación de la coenzima reducida (Blackwell *et al.*, 1987), mientras que para la ALDH2 es la desacilación o liberación del acilo (Weiner *et al.*, 1976) y finalmente, para la ALDH3A1, el paso limitante es la transferencia del hidruro (Mann *et al.*, 1999).

Cuando el paso limitante se encuentra después de la transferencia del hidruro, es posible medir el fenómeno denominado “explosión” (del inglés burst), el cual es el resultado de la fluorescencia del NADH generado en el primer ciclo catalítico antes del estado estacionario de la reacción (Yoval-Sánchez *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha reportado que algunos cationes divalentes, como el Ca^{2+} , el Mg^{2+} y el Mn^{2+} , afectan la actividad específica de algunas isoformas de aldehído deshidrogenasas humanas, lo que nos permite diferenciar la etapa limitante de la reacción en cada una. Estos cationes incrementan la actividad de la ALDH2, inhiben a la ALDH1A1 y no ejercen efecto sobre la actividad de la ALDH3A1 (Ho *et al.*, 2005). Estudios cristalográficos revelaron que el Mg^{2+} interactúa con el grupo pirofosfato del NADH, lo que promueve que la coenzima se una más fuertemente a la enzima, haciendo más lenta su velocidad de liberación; al ser éste el paso limitante de la reacción en la ALDH1A1, se observa una disminución en la velocidad global de la reacción (Takahashi *et al.*, 1980; Vallari *et al.*, 1984). La unión de este catión también promueve que la coenzima reducida adopte la conformación de salida del sitio activo, lo cual favorece que ocurra la desacilación y al ser éste el paso limitante de la reacción para la ALDH2, el resultado es un incremento en la velocidad global de la reacción de esta enzima (Dickinson, *et al.*, 1982; Bennett, *et al.*, 1983).

Capítulo 3. Activadores de las Aldehído Deshidrogenas

Moduladores que incrementan la velocidad de las ALDHs

Debido a la participación de las ALDHs en diferentes procesos fisiopatológicos, es importante estudiar y diseñar compuestos y estrategias para modular su actividad. Anteriormente, se reportaron como activadores de la ALDH1A1 el dietilestilbestrol y la 2,2-ditiopiridina, proponiéndose que la unión de estos compuestos generaba una nueva forma de la enzima con propiedades cinéticas modificadas y la activación se producía debido a cambios conformacionales (Kitson *et al.*, 1982). Sin embargo, no se estudió con profundidad la activación por estos compuestos y el incremento en velocidad no resultó ser significativo. Actualmente, se han estudiado otros compuestos como moduladores de la actividad en ALDHs, entre ellos destaca el alda-1 (N-(1,3-Benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida) como activador de ALDH2, el cual además de incrementar la velocidad de la enzima, se ha reportado que actúa como cardioprotector en eventos de isquemia/reperfusión en un modelo animal, reduciendo el tamaño del área infartada (Chen *et al.*, 2008). De igual forma, se ha reportado otro activador para la ALDH2, la piperlonguminina que, al igual que el alda-1, incrementa la velocidad de ALDH2 y actúa como cardioprotector en eventos de isquemia/reperfusión en ratas (Yoval-Sánchez *et al.*, 2020). La ventaja de este último activador es que a diferencia del alda-1, que es un compuesto sintetizado en el laboratorio, la piperlonguminina es un compuesto de origen natural que se extrae de la pimienta negra que es ampliamente utilizada en la medicina tradicional en la India. Como se mencionó anteriormente, alda-1 es un activador no esencial de ALDH2 y en la estructura cristalográfica, este compuesto se une a la entrada del sitio de unión del aldehído modificando el sitio catalítico (Perez-Miller *et al.*, 2010), los efectos de la unión de alda-1 a la enzima incluyen la disminución del pKa de la cisteína catalítica más de 1 unidad de pH, favoreciendo la reactividad de este residuo. El efecto de este compuesto sobre la enzima modifica el orden de entrada de los sustratos y la liberación de productos, alterando las propiedades cinéticas de ALDH2. El mecanismo de activación de la enzima está relacionado con la modificación de la velocidad del paso limitante de

la reacción, haciéndolo menos limitante, promoviendo que la reacción global transcurra más rápido (Belmont-Díaz *et al.*, 2016). Alda-1 no solo activa a ALDH2, sino que también mejora la estabilidad de la enzima, protegiéndola de la inactivación por aldehídos lipídicos (Perez-Miller *et al.*, 2010). Debido a la importancia que posee ALDH2 por su localización mitocondrial, se ha propuesto como blanco terapéutico para disminuir el estrés oxidativo, por lo que se ha evaluado la activación de ALDH2 en varios modelos patológicos como procesos neurodegenerativos (Stachowicz *et al.*, 2017), hipertensión arterial (Xu *et al.*, 2017) y daño hepático (Zhang *et al.*, 2018).

Otro activador reportado es el tamoxifen que genera un incremento en la velocidad de la ALDH1A1 (Belmont-Díaz *et al.*, 2015). El tamoxifen es una droga que se utiliza en la terapia de cáncer de mama como antagonista de los receptores de estrógenos. Sin embargo, recientemente se reportó como un activador específico de ALDH1A1. En la enzima humana recombinante, este compuesto es un activador de tipo no esencial (Belmont-Díaz *et al.*, 2015). Además de incrementar la velocidad máxima de la enzima, se observó que el tamoxifen confiere estabilidad estructural a la proteína, protegiéndola de la desnaturalización térmica.

Ninguno de los compuestos antes mencionados ha sido evaluado clínicamente como activador de las ALDHs. Entonces, es importante continuar con la búsqueda y diseño de moléculas capaces de activar ALDHs o de proteger estas enzimas de la inactivación por aldehídos lipídicos para poder emplearlas con éxito en patologías donde se incremente el estrés oxidativo.

Hipótesis

El metabolito derivado del omeprazol se unirá al sitio activo de la ALDH1A1 activando a la enzima y promoviendo la protección celular del estrés oxidante.

Objetivo general

Caracterizar el mecanismo de activación del omeprazol en la ALDH1A1 y evaluar su potencial de protección del estrés oxidante en cultivos celulares.

Objetivos particulares

1. Realizar la caracterización cinética de la ALDH1A1 humana recombinante con omeprazol.
2. Determinar el tipo de interacción que presenta el metabolito generado a partir del omeprazol con el sitio activo de la enzima.
3. Discernir el mecanismo de activación de ALDH1A1 por omeprazol.
3. Evaluar el efecto del activador sobre el crecimiento de cultivos celulares expuestos a un estrés oxidante inducido por el peróxido de hidrógeno.
4. Medir la actividad de enzimas antioxidantes y de marcadoras de daño celular en extractos provenientes de células tratadas con omeprazol, expuestas a estrés oxidante inducido por peróxido de hidrógeno.
5. Evaluar la función mitocondrial en mitocondrias aisladas de células protegidas del estrés oxidante por el tratamiento con omeprazol.

Materiales y Métodos

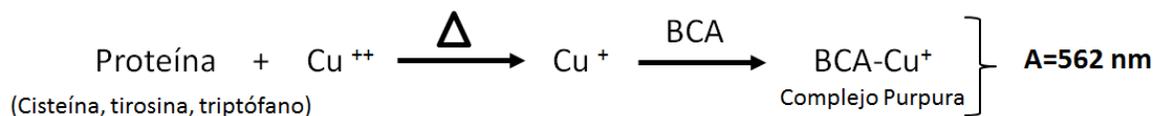
Expresión y purificación de las enzimas recombinantes

Se inocularon 10 mL de medio LB con una colonia de células de *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido con el gen que codifica para la proteína de interés y se incubó toda la noche a 37 °C a 200 rpm. Con este precultivo se inoculó 1 L de medio para sobreexpresión de proteínas 2XYT (compuesto por 16 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 5 g de NaCl, disueltos en un litro de agua) y se incubó a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína agregando 0.4 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se continuó la incubación toda la noche en agitación constante. Para la purificación de la enzima se cosecharon las células centrifugando a 4500 rpm durante 10 min y se realizaron 2 lavados con 100 mL de NaCl 0.9% cada uno. Las células se resuspendieron en un amortiguador conteniendo fosfato de sodio 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y de 2-mercaptoetanol 3 mM (amortiguador A) y se rompieron por sonicación en hielo, utilizando un sonicador marca MSE, modelo Soniprep 150 a 100 MHz de potencia, con ciclos de 15 s sonicación/1 min descanso. Posteriormente, el extracto celular se centrifugó a 45000 rpm durante 30 min y el sobrenadante resultante se inyectó en una columna de afinidad acoplada a níquel, equilibrada con amortiguador A a 4°C. La columna se lavó con 50 mL de amortiguador A suplementado con 50 mM de imidazol y la proteína se eluyó de la columna mediante un gradiente lineal de imidazol de 50-500 mM en un volumen final de 100 mL. La proteína pura se concentró utilizando filtros Amicon de límite de exclusión molecular de 30-50 kDa, se lavó con amortiguador de fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 a 4°C y se guardó en 50% de glicerol, a - 20°C, hasta su utilización.

Cuantificación de la proteína

Previo a la cuantificación de la proteína purificada, se eliminaron agentes que pudieran interferir con la determinación. Para ello, se tomó una alícuota de 50 µL

de la enzima y se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 13% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en una solución de NaOH 0.1N y 5% de SDS, en un volumen final de 50 µL. La cuantificación se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), cuyo fundamento se basa en la formación de un complejo púrpura intenso, al reaccionar el ácido bicinconínico con iones Cu^{1+} en un medio alcalino.



Se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) (5-100 µg de proteína total); posteriormente, se añadieron 2 mL de la mezcla de reacción (Mezcla 50:1 del reactivo A y B. Reactivo A; 750 mM carbonato de sodio, 87 mM tartrato de sodio, 120 mM BCA, pH 11.25 y Reactivo B; solución 3.6 mM de sulfato cuproso en agua) a los tubos de la curva patrón y a las muestras problema. Los tubos se incubaron 15 min a 60 °C, se atemperaron y se evaluó la absorbancia a 562 nm.

Electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida

Para realizar el seguimiento de la purificación, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) para separar proteínas con respecto a su peso molecular en condiciones desnaturizantes, de acuerdo al método descrito por Laemmli en 1970. En este método, el SDS desnaturiza a las proteínas y les confiere carga neta negativa, de esa manera, las proteínas migran hacia el ánodo y se separan únicamente por su peso molecular. Para esto, se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS; gel separador: 10% solución acrilamida-bisacrilamida (29:1), 0.5 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.05% APS; gel concentrador: 5% solución acrilamida-bisacrilamida (29:1) 0.1 M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.07% TEMED,

0.07% APS. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% azul de bromofenol, y 100 mM DTT), en proporción 1:1 y se hirvieron durante 5 min en baño maría. El gel se corrió a 150 volts por 60 min en una cámara de electroforesis mini protean 3 (Bio-Rad), con amortiguador de corrida que contiene: 250 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.1% SDS. Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.05 % en una mezcla de metanol al 50% y ácido acético al 10% en agua. Posteriormente, se destiñó con una mezcla de ácido acético al 10% y metanol al 50% en agua. El porcentaje de pureza de las proteínas recombinantes se determinó realizando un análisis densitométrico del gel teñido, con ayuda del programa ImageJ (Maryland, EU).

Análisis cinético

Caracterización cinética

La actividad enzimática de ALDH se determinó en un amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4, a 25 °C, en presencia de 1-2 mM de NAD⁺ usando un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1800. La reacción se inició con la adición del aldehído correspondiente midiendo la absorbancia a 340 nm, debida al NADH generado durante la reacción. Los resultados se analizaron por regresión no lineal usando la ecuación de Michaelis-Menten. Para dicho análisis se utilizó el software MicrocalOrigin v.8.0 (Northampton, Massachusetts, EU).

Ecuación de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$$

Ecuación de inhibición por sustrato

$$v = \frac{V_m \times [B]}{K_{mB} \left(1 + \left(\frac{K_{ia} \times K_{mB}}{[A]} \times \left(1 + \frac{[B]}{K_i} \right) \right) \right) + [B] \left(1 + \left(\frac{K_{mA}}{[A]} \times \left(1 + \frac{[B]}{K_i} \right) \right) \right)}$$

Protocolo de activación por omeprazol

Para la activación de la proteína recombinante, se tomaron 15-30 μg de la enzima que fueron incubados con 1 mM de NAD^+ y 20 μM de omeprazol. La mezcla fue expuesta a la luz a 310 nm durante 5 min en agitación constante utilizando un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Series 2, con una apertura de paso de luz de 16 nm. La actividad fue medida como se describió anteriormente. El omeprazol se preparó en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO)/metanol (1:1) y se calibró espectrofotométricamente ($\epsilon_{304} = 14.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para evaluar la posible orientación de la molécula de omeprazol en el sitio de unión del aldehído, se utilizaron compuestos derivados del omeprazol como pantoprazol, lansoprazol y rabeprazol. Para este ensayo la enzima se activó con estos derivados de la forma anteriormente descrita para el omeprazol y se evaluó la actividad de la enzima activada con propionaldehído, benzaldehído y 4-HNE. También se incubó la ALDH1A1 activada con omeprazol con diferentes concentraciones del inhibidor competitivo de ALDH daidzina, en un experimento de competencia para reforzar la propuesta de unión de omeprazol en el sitio de unión del aldehído.

Determinación del paso limitante

El ensayo para determinar el paso limitante de la reacción se evaluó midiendo la actividad enzimática en presencia y ausencia de 2 mM de MgCl_2 , el cual disminuye la velocidad de liberación de la coenzima, pero acelera la desacilación. Este ensayo se hizo usando la enzima activada y no activada con omeprazol, en presencia de 2 mM de NAD^+ y 1 mM de propionaldehído. Para realizar la comparación, se tomó el porcentaje de actividad con respecto a la condición sin MgCl_2 . La proporción de la actividad en ausencia y presencia de MgCl_2 fue usada como indicador de la alteración en el paso limitante de la reacción. Esto también se hizo midiendo la actividad de la enzima con algunos aldehídos sustituidos (acetaldehído deuterado, cloro-acetaldehído y metoxi-acetaldehído), en condiciones saturantes de sustratos y para hacer la comparación se tomó como 100% la actividad con acetaldehído.

Ensayo de inactivación enzimática

La proteína (15-30 μg) fue incubada en 100 μL de amortiguador de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.4) sin 2-mercaptoetanol, en presencia de diferentes concentraciones de acroleína y 4-HNE durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, la enzima fue diluida 40 veces con amortiguador de fosfato de sodio pH 7.4 y la actividad remanente fue evaluada con 1 mM de NAD^+ y 1 mM de propionaldehído. Para la condición con omeprazol la enzima fue activada con el modulador usando el protocolo descrito anteriormente antes del ensayo de inactivación.

Análisis de la estabilidad de la proteína

Desnaturalización por temperatura

El ensayo de estabilidad térmica se llevó a cabo incubando la enzima concentrada activada y no activada por omeprazol a 45 °C. La actividad se evaluó en alícuotas tomadas a diferentes tiempos diluyendo la enzima 10 veces con amortiguador de fosfato de sodio pH 7.4 a 25 °C. El trazo de actividad se inició con la adición de 1 mM de NAD^+ y 1 mM de propionaldehído.

Desnaturalización por cloruro de guanidina

Se determinó la estabilidad estructural de la proteína mediante el desplegamiento de la enzima con cloruro de guanidina (GdnHCl). Para esto se incubaron muestras de ALDH1A1 activada y no activada con omeprazol durante 4 h a 25 °C en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y a diferentes concentraciones de GdnHCl . El cambio en la fluorescencia intrínseca fue determinado usando un espectrofluorómetro (Aminco Bowman Series2). La longitud de onda de excitación usada fue 280 nm, ya que en ese valor se registra el pico máximo de excitación para esta enzima, mientras que el espectro de emisión se registró en un intervalo de 300 a 400 nm, tomando el valor de fluorescencia a 337 nm. Los datos experimentales se analizaron asumiendo que la transición entre las conformaciones plegadas y desplegadas era una reacción de dos estados.

Evaluación de la naturaleza de la unión del omeprazol a la proteína

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Para el análisis de espectrometría de masas, la enzima activada y no activada con omeprazol, fue desnaturalizada incubando con 3.5 M de GdnHCl durante 4 h, pues a esta concentración se alcanzó la máxima desnaturalización de la proteína (para obtener esta concentración se hizo una curva de desnaturalización de ALDH1A1 a diferentes concentraciones de GdnHCl). Posteriormente, la proteína se lavó mediante ultra filtración con agua destilada utilizando un filtro Amicon de 30 kDa. Para determinar la masa, las proteínas concentradas se resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA) y se analizaron mediante MALDI-TOF (MS/MS), utilizando un espectrómetro de masas ultrafluo-extremo (Bruker, EE. UU.). Se utilizó una matriz de ácido sinápinico (SA) siguiendo el protocolo de gota seca. Para el análisis se consideraron espectros con picos de intensidad de 1×10^3 - 1×10^4 .

Ensayo de competencia con p-nitrofenilacetato

La actividad de esterasa de ALDH1A1 se determinó midiendo la hidrólisis de p-nitrofenilacetato (pNFA; es importante mencionar que para la actividad de esterasa no se requiere la presencia de la coenzima). En una cubeta de reacción de 1 mL se adicionó el amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.4) y concentraciones variables de pNFA. La hidrólisis basal de pNFA se registró a 400 nm ($\epsilon_{400} = 14\ 030\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ a pH 7.5) en un espectrofotómetro de diodos Agilent 8453. La reacción se inició con la adición de la enzima (10-20 μg). La tasa neta de hidrólisis se calculó restando la hidrólisis basal de la hidrólisis obtenida después de la adición de la enzima. Para determinar el efecto del NADH, se realizó el mismo experimento en presencia de 10 y 25 μM de NADH. En el caso de la enzima activada con omeprazol, primero se diluyó la enzima y se concentró hasta alcanzar una dilución de 400 veces y la actividad de esterasa se determinó en presencia de 100 y 250 μM de NADH.

Ensayos de la protección celular del estrés oxidante generado por H₂O₂

Ensayo de protección con células de *E. coli* BL21

Este ensayo se realizó utilizando células *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido conteniendo el gene que codifica para ALDH1A1 humana, incubadas en medio mínimo M9 (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 10 mM NaCl, pH7.4) suplementado con 28 mM de glicerol como fuente de carbono; una vez esterilizado, al medio se le adicionó 20 mM NH₄Cl estéril. Para inducir la expresión de la proteína se agregó 0.4 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); como control se incluyeron bacterias sin adición de IPTG. Los cultivos se iniciaron con una densidad óptica de 0.1 a 600 nm y se incubaron durante tres horas en presencia de IPTG, para permitir la expresión de ALDH1A1 antes de la inducción del estrés oxidativo. Pasado este tiempo las células se incubaron con omeprazol durante 1 h, se lavaron con medio M9 para eliminar la fracción de omeprazol que no ingresó a la célula y luego se expusieron durante 10 min a la luz con una longitud de onda de 310 nm, utilizando un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Serie 2 con un paso de luz de 16 nm. Posteriormente, las células se expusieron a un pulso de 20 mM H₂O₂. El crecimiento se midió determinando la densidad óptica del cultivo a 600 nm cada hora, hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Para el experimento, las células se trataron en seis condiciones diferentes: (1) Células que expresaban la ALDH1A1 humana sin tratamiento con omeprazol, en ausencia de H₂O₂; (2) Células que expresaron ALDH1A1 sin tratamiento con omeprazol y luz, expuestas a 20 mM de H₂O₂; (3) Células que expresaron ALDH1A1 sin tratamiento con omeprazol, expuestas a la luz y 20 mM de H₂O₂; (4) Células que expresaron ALDH1A1 incubadas con 100 μM de omeprazol, sin exposición a la luz y expuestas a 20 mM de H₂O₂; (5) Células que no expresaban ALDH1A1 (en ausencia de IPTG), incubadas con 100 μM de omeprazol, expuestas a la luz y 20 mM de H₂O₂; (6) Células que expresaron ALDH1A1 incubadas con 100 μM de omeprazol, expuestas a la luz y 20 mM de H₂O₂. Finalmente, las células del experimento anterior se cosecharon por centrifugación y se rompieron mediante sonicación. En los extractos, se midió la

actividad de ALDH como se indicó anteriormente y se evaluaron los niveles de aldehídos lipídicos.

Aislamiento de células AS30D y ensayo de protección

Las células de hepatoma AS-30D, se propagaron mediante inyección intraperitoneal de $2-5 \times 10^8$ células en ratas Wistar hembras de 250 g de peso. Después de 5-7 días, las células se aislaron del líquido ascítico y se lavaron 6-8 veces con amortiguador Ringer-Krebs (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.4 mM, KH₂PO₄ 1 mM y Hepes 25 mM, pH 7.4). Luego, las células se resuspendieron en un volumen equivalente al de la pastilla y se cuantificó la proteína. Para los experimentos de exposición al H₂O₂, se añadió una concentración de células de AS-30D de 15 mg de proteína/mL en un volumen final de 2 mL y se expusieron a diferentes concentraciones de H₂O₂ por 1 h para obtener una CI₅₀. Posteriormente, para determinar la concentración óptima de omeprazol y el tiempo de incubación a utilizar, se expusieron las células a diferentes concentraciones de omeprazol y se varió el tiempo de incubación con omeprazol, así como el tiempo de exposición a la luz a una longitud de onda de 310 nm. Se determinó una concentración óptima de omeprazol de 100 µM y un tiempo de 1 h de incubación a 37 °C. Mientras que se determinó un período óptimo de incubación a la luz de 10 min. Luego, las células se lavaron con amortiguador Ringer-Krebs, se cosecharon centrifugando a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 2 mL del mismo amortiguador. Se ensayaron diferentes concentraciones del inhibidor disulfiram incubando por 30 min, para encontrar una concentración inhibidora, que disminuyera de manera importante la actividad de ALDH, pero no afectara la viabilidad de las células AS-30D y se determinó una concentración de disulfiram de 8 µM. Las células se incubaron durante 30 min con este compuesto a 37 °C; transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente, se cosecharon y se resuspendieron en 2 mL de Ringer-Krebs pH 7.4. Se incubaron con H₂O₂ 75 mM (LD₅₀ a 1 h de incubación), durante 1 h a 37 °C y al final de ese tiempo se recuperó una alícuota para medir la viabilidad celular con

azul tripano. El resto de las células se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. El botón fue suspendido en 1 ml de Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM y PMSF 1 mM, pH 7.4. Las células se rompieron mediante 3 ciclos de congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación (en agua a 37 °C) y el extracto se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante para medir las actividades enzimáticas.

Determinación de la actividad enzimática

Aconitasa. Este ensayo se llevó a cabo en amortiguador KME (KCl 10 mM, MOPS 1 mM y EGTA 1 mM) pH 7.2 en presencia de 1-2 U de isocitrato deshidrogenasa comercial dependiente de NADP⁺, 2 mM de citrato de sodio, 1 mM de MnCl₂ y 2 mM de NADP⁺. La reacción específica de la aconitasa se inició con la adición de 0.02-0.05 mg del extracto celular, y se siguió la formación de NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). La medición se realizó en un espectrofotómetro UV-1800 marca Shimadzu. La omisión de citrato de sodio de la mezcla de reacción no produjo actividad alguna.

Superóxido dismutasa. La actividad de SOD se determinó mediante un ensayo competitivo utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa para reducir el nitro azul de tetrazolio (NBT). La actividad se determinó mediante espectrofotometría midiendo la reducción de NBT a formazán a 560 nm. Se añadió el extracto (0,02 mg) en 1 mL de solución compuesta por fosfato de potasio 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.8 y adicionando 1 U/mL de catalasa, 0.06 mM de NBT, 0.06 mg/mL de albúmina y 0.25 mM de xantina a 25 °C . La reacción se inició añadiendo 15 µg de xantina oxidasa.

Catalasa. El ensayo de actividad de catalasa, se llevó a cabo en amortiguador KME pH 7.2 en presencia de 5 mM de H₂O₂. Para corregir la reacción no enzimática del H₂O₂, se agregaron 0.02-0.05 mg del extracto, una vez que se produjo la reacción espuria durante unos segundos, se siguió la desaparición del

H₂O₂ a 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). La medición se realizó en un espectrofotómetro UV-1800 marca Shimadzu.

Glutación peroxidasa. El ensayo de actividad de GPx se llevó a cabo en amortiguador KME pH 7.2 en presencia de 1,5-2 U de glutación reductasa comercial, 8 mM de glutación reducido (GSH) y 0.15 mM de NADPH. Para corregir la reacción no enzimática de peróxidos con los sustratos reducidos GSH y NAPH, se agregó a la mezcla de ensayo 0.6 mM de hidroperóxido de terbutilo. Una vez que se produjo la reacción espuria durante unos segundos, se inició la reacción específica de GPx con la adición de 0.02-0.05 mg del extracto y se siguió la desaparición del NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). La medición se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1800. La omisión de GSH de la mezcla de reacción no produjo actividad alguna.

Glutación S-transferasa. El ensayo de actividad de la GST se llevó a cabo en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.5 en presencia de 5 mM de GSH y 5 mM de 2-4 dinitroclorobenceno (DNCB). Para corregir la reacción no enzimática se mide la reacción entre el GSH y el DNCB, una vez que se produjo la reacción espuria durante unos segundos, se inició la reacción específica de la GST con la adición de 0.02-0.05 mg del extracto y se sigue la aparición del conjugado a DNCB-GSH a 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). La medición se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1800. La omisión de GSH de la mezcla de reacción no produjo actividad alguna.

Aldehído deshidrogenasa. El ensayo de actividad de ALDH se llevó a cabo adicionaron 0.02-0.05 mg del extracto en amortiguador de fosfato de sodio 100 mM y NaCl 100 mM pH 7.4 en presencia de 1 mM de NAD⁺ y 100 μM de pirazol. Para corregir la reacción no enzimática se agregó el extracto en ausencia de sustrato y una vez que se registró la reacción espuria durante unos segundos, se inició la reacción específica de ALDH con la adición de 1 mM de propionaldehído y se siguió la aparición de NADH. La medición se realizó en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Series 2 utilizando longitudes de onda de excitación y de emisión de 340 y 460 nm, respectivamente. Para obtener la velocidad máxima en mU/mg

se realizó una curva patrón variando la concentración de NADH en el espectrofluorómetro utilizando una solución de NADH calibrada en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1800 utilizando el $\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del NADH.

Lactato deshidrogenasa. El ensayo de actividad de LDH se llevó a cabo en amortiguador KME pH 7.2 en presencia de 0.2 mM de NADH. Para corregir la reacción no enzimática se adicionaron 0.02-0.05 mg del extracto. Una vez que se produjo la reacción espuria durante unos segundos, se inició la reacción específica de LDH con la adición de 1 mM de piruvato de sodio y se siguió la aparición de NADH a 340 nm. La medición se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro con detector de diodos Agilent 8453 con adaptador de multicelda y temperatura controlada.

Determinación de los productos de lipoperoxidación. Los niveles de malondialdehído (MDA) se determinaron usando el protocolo reportado por Gerard-Monnier *et al.*, en el que en presencia de ácido metanosulfónico, el 1-metil-2-fenilindol reacciona con aldehídos formando una carbocianina y la absorbancia del compuesto resultante se puede leer a 586 nm ($\epsilon= 110\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Aislamiento de mitocondrias de células AS30D

Para el aislamiento mitocondrial se lavaron e incubaron células en amortiguador SHE compuesto por sacarosa 220 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.3 a 4 °C, en presencia de 10 μg de digitonina/mg de proteína y 1% de albúmina. Después de 10 min de incubación, las células se sometieron a una ligera homogeneización utilizando un homogenizador de vidrio-teflón Potter-Elvehjem, durante 5 min. La suspensión de células parcialmente homogeneizadas se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se descartó. Luego, el sedimento se resuspendió en amortiguador SHE y esta vez se homogeneizó completamente. El homogeneizado se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y se descartó el botón. El sobrenadante que contenía mitocondrias se centrifugó a

10000 rpm durante 10 min, el sedimento resultante se resuspendió en 1 ml de amortiguador SHE y se incubó en presencia de 0.2 % albúmina libre de ácidos grasos y ADP 1 mM durante 10 min. Luego, la fracción mitocondrial se diluyó a 30 mL con amortiguador SHE y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió la fracción mitocondrial en 500 µl de amortiguador SHE. La concentración de proteínas se determinó según el método del BCA.

Respiración mitocondrial

La tasa de respiración mitocondrial se determinó usando un electrodo de O₂ tipo Clark en un amortiguador compuesto por KCl 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 0.5 mM pH 7.3, saturado de oxígeno a 37 °C. Se incubaron mitocondrias (0.5 mg) en presencia de glutamato 5 mM más malato 5 mM como sustratos y KH₂PO₄ 5 mM. Para determinar la respiración de estado 3, se añadieron 600 nmol de ADP a la mezcla de ensayo.

Determinación de la formación del potencial mitocondrial transmembranal

El potencial transmembranal se determinó incubando mitocondrias (0,2 mg de proteína) en amortiguador KME compuesto por KCl 120 mM, MOPS 20 mM pH 7,3, EGTA 0,5 mM y fosfato de potasio 5 mM, a 37 °C, utilizando glutamato 5 mM y malato 5 mM como sustratos, en presencia de 50 nM de rodamina 123; donde se indica, se añadió ADP 50 µM a la cubeta para iniciar la síntesis de ATP. La cuantificación se realizó excitando la muestra a una longitud de onda de 493 nm y registrando la emisión a 525 nm, en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Serie 2 equipado con agitador y controlador de temperatura, y burbujeando el amortiguador en la cubeta con oxígeno. Al final de los experimentos, se añadió CCCP 1 µM a la cubeta para colapsar el gradiente y calcular el valor máximo de formación de gradiente.

Resultados y Discusión

Análisis de acoplamiento molecular de ALDH con omeprazol

El análisis de acoplamiento reveló que el omeprazol puede unirse al sitio activo de ALDH1A1 humana con alta afinidad (K_d de 1,3 μM), mientras que para ALDH2 y ALDH3A1 esta fue mayor (K_d de 3,4 y 5,8 μM , respectivamente). El análisis también predijo dos posibles orientaciones para la molécula de omeprazol en el sitio de unión al aldehído de la enzima, una con el anillo de piridina y otra con el anillo de bencimidazol orientado hacia la cisteína catalítica (Cys 302; Figura 6A y 6B).

Para evaluar el efecto del omeprazol sobre ALDH1A1, se ensayó la actividad de la enzima humana recombinante en presencia de este compuesto. Como sugirió el análisis de docking, el omeprazol activó ALDH1A1 con un incremento sobresaliente en la actividad de 4 a 6 veces, a una concentración saturada de sustratos; la activación máxima se alcanzó a 20 μM del compuesto. El omeprazol también se ensayó con ALDH2 y ALDH3A1 humanas, pero no se observó ningún efecto sobre la actividad de estas isoformas (Figura 6C), incluso a una concentración de 100 μM .

Para descartar que la activación estuviera relacionada con un cambio en el estado de oligomerización de la proteína, se sometió a la enzima ALDH1A1 activada con omeprazol a cromatografía de exclusión molecular, pero no se observaron diferencias en el peso molecular entre la enzima activada con omeprazol y el control.

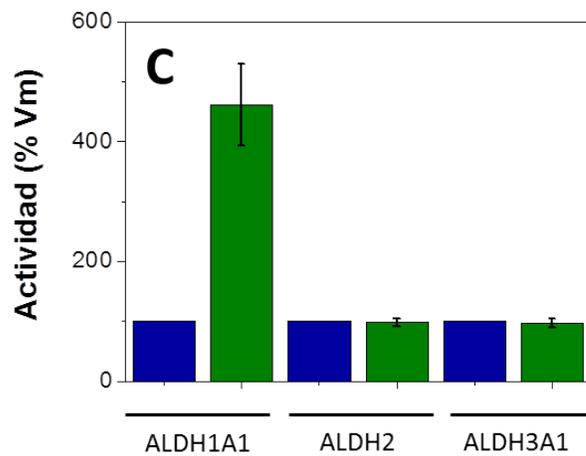
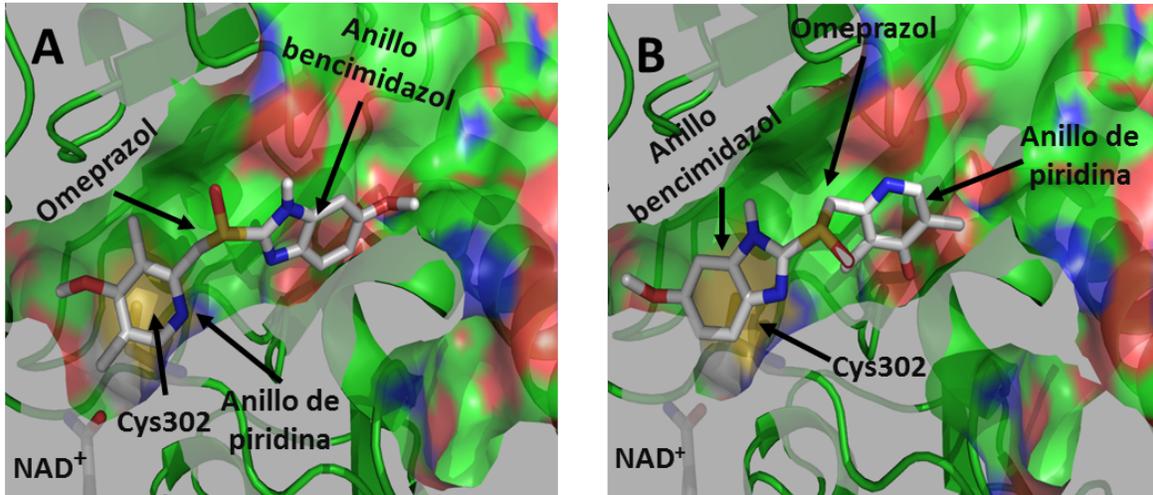


Figura 6. Resultados del análisis de acoplamiento molecular de omeprazol en el sitio activo de ALDH1A1. Se presenta un corte del sitio activo de la proteína que muestra la orientación del omeprazol en las dos conformaciones predichas en el sitio de unión del aldehído. (A), conformación de omeprazol con el anillo de piridina frente a C302. (B), conformación de omeprazol con el anillo de bencimidazol frente a C302. La proteína se muestra como superficie con el interior en listones; el omeprazol se muestra como bastones, indicando partes de la molécula con flechas; y C302 se muestra como bastones en un área amarilla señalada con una flecha. (C) Efecto del omeprazol sobre ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1 humanas; las barras azules muestran las enzimas sin omeprazol y las barras verdes representan las enzimas tratadas con omeprazol.

Como sugiere el análisis de acoplamiento molecular, el omeprazol interactuó con la ALDH1A1 humana y aumentó la actividad en aproximadamente 10 veces en comparación con Alda-1 (Belmont-Díaz *et al.*, 2016) y tamoxifen (Belmont-Díaz *et al.*, 2015), convirtiéndose en el activador más potente de esta enzima reportado hasta ahora. Sin embargo, el omeprazol no afectó la actividad de ALDH2 y ALDH3A1 humanas. La falta de efecto del omeprazol sobre estas enzimas puede estar relacionada con las diferencias en el volumen y la composición de aminoácidos del sitio activo entre las tres enzimas, lo que dificultaría la unión y estabilización del fármaco en ALDH2 y ALDH3A1. Otra posibilidad es que el omeprazol modifique el paso limitante del mecanismo de reacción en ALDH1 A1 pero no en las otras isoformas, ya que como se mostró anteriormente, estas enzimas poseen un paso limitante diferente (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2005; Mann *et al.*, 1999).

Curiosamente, el grado de activación de omeprazol de ALDH1A1 fue mayor (de 4 a 5 veces) cuando se utilizaron en el ensayo alícuotas de preparaciones antiguas de la enzima (reservas enzimáticas almacenadas con glicerol al 50% a -20 °C durante más de 6 meses, datos no mostrados), lo que sugiere que el omeprazol actúa reestructurando la enzima para recuperar su actividad. Un efecto similar de Alda-1 en ALDH2*2 (variante asiática) fue reportado previamente, mostrando que el activador reestructuró la enzima, restaurando la afinidad y actividad de la coenzima, actuando así como una chaperona molecular (Perez-Miller *et al.*, 2010).

Se llevaron a cabo experimentos adicionales con derivados de omeprazol con diferentes sustituyentes en el anillo de piridina (lansoprazol y rabeprazol) o en los anillos de bencimidazol (pantoprazol) (Figura 7A y 8B), para tener indicios sobre la orientación de la molécula de activador en el sitio activo. La activación de ALDH1A1 conseguida con pantoprazol fue similar a la provocada por omeprazol, pero cuando se analizó el lansoprazol, la activación observada fue aproximadamente la mitad de la obtenida con omeprazol. Así mismo, la activación alcanzada con rabeprazol (el derivado que tenía el sustituyente de mayor longitud en el anillo de piridina), fue la más baja observada (Figura 7B).

El efecto del omeprazol y derivados de omeprazol también se evaluó en presencia de benzaldehído (un aldehído voluminoso) y 4-HNE (un aldehído con una cadena alifática larga; Figura 3). Se observó un menor grado de activación con omeprazol y lansoprazol, cuando se utilizó benzaldehído como sustrato, y no hubo diferencia significativa cuando rabeprazol fue el activador con este sustrato, en comparación con el control (Figura 7C). Con 4-HNE, la actividad fue aproximadamente el doble en la enzima activada con omeprazol, pero no hubo activación con lansoprazol o rabeprazol, en comparación con el control en ausencia de activador (Figura 7C).

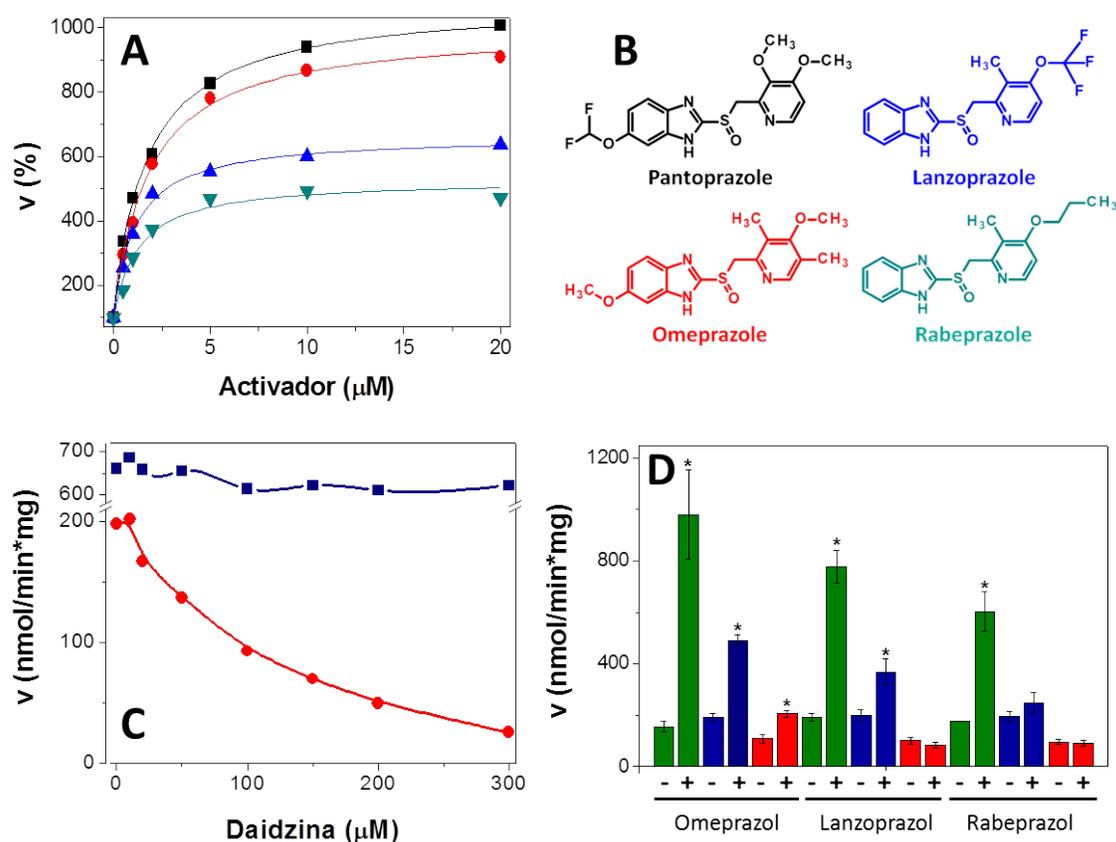


Figura 7. Activación de ALDH1A1 humana por omeprazol y algunos derivados de omeprazol. (A), Diferencias en la magnitud de activación de ALDH1A1 por derivados de omeprazol: ■, pantoprazol; ●, omeprazol; ▲, lansoprazol; ▼, rabeprazol. La actividad de ALDH1A1 se determinó como se indica en la sección materiales y métodos. La constante catalítica k_{cat} en ausencia de activador ($44 \pm 4 \text{ min}^{-1}$) se consideró como 100%. Los datos se ajustaron a la ecuación de

Michaelis-Menten. (Los valores de $K_{0.5}$ en μM y % de activación fueron 2 ± 0.2 y 671 ± 208 ; 1.6 ± 0.2 y 800 ± 282 ; 1.3 ± 0.2 y 483 ± 70 ; 1.4 ± 0.3 y 370 ± 110 , para omeprazol, pantoprazol, lansoprazol y rabeprazol, respectivamente). (B), Estructuras de los derivados de omeprazol utilizados en este estudio. (C) Protección por omeprazol de la inhibición de ALDH1A por daidzina. En círculos rojos se muestra la inhibición de la enzima por daidzina en ausencia de omeprazol y los cuadrados negros muestran el efecto de daidzina sobre la enzima previamente activada con omeprazol. (D), Efectos de los aldehídos de cadena alifática corta, aromática voluminosa y alifática larga sobre el grado de activación de ALDH1A1. En este experimento se activó ALDH1A1 con omeprazol y sus derivados lansoprazol y rabeprazol, y se ensayó la actividad con diferentes sustratos. Las barras verdes muestran la actividad con propionaldehído, las barras azules muestran la actividad con benzaldehído y las barras rojas muestran la actividad con 4-HNE. Los resultados son la media \pm DE en experimentos con tres preparaciones enzimáticas independientes. (* $p < 0,001$ con respecto a la actividad de la enzima sin omeprazol (prueba t de Student)).

Estos datos sugieren que el omeprazol está orientado con el anillo de piridina hacia la cisteína reactiva (C302) en el sitio activo y que los sustituyentes en este anillo pueden presentar un impedimento estérico durante la catálisis; este efecto fue más evidente con el sustituyente más voluminoso (Figura 7D). A pesar de la menor activación obtenida con lansoprazol y rabeprazol, estas moléculas junto con omeprazol y pantoprazol son los activadores más potentes de ALDH1A1 reportados hasta la fecha, ya que la activación por Alda-1 y tamoxifen sobre esta enzima fue de solo alrededor de 0,6-0,8-veces (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2019).

Se obtuvo evidencia adicional de la unión de omeprazol en el sitio de unión de aldehído de ALDH1A1 y la orientación adoptada por este activador, cuando se evaluó el efecto de omeprazol y derivados de omeprazol utilizando benzaldehído o 4-HNE como sustratos (Figura 7D). La correlación del menor efecto observado con benzaldehído con el incremento de tamaño de los sustituyentes del anillo de piridina, así como el efecto activador nulo de estos derivados de omeprazol con el

4-HNE como sustrato, apoyan la hipótesis de que el anillo se orienta hacia la cisteína catalítica y que los sustituyentes en este anillo reducen el volumen del sitio activo, limitando la reacción con aldehídos grandes o voluminosos.

Estos datos indican que el activador de hecho está interactuando con el sitio de unión del aldehído. Se han reportado resultados similares de activación más baja con benzaldehído para la activación de ALDH2 por Alda-1, y se interpretaron como una evidencia de disminución del volumen del sitio activo después de la unión de este activador (Chen *et al.*, 2008), que luego se demostró en la estructura de la variante asiática ALDH2*2 unida al Alda-1 (código PDB 3INL; Perez-Miller *et al.*, 2010).

Para explorar más a fondo la interacción del omeprazol en el sitio de unión al sustrato de ALDH1A1, se llevó a cabo un experimento de competencia con daidzina, un inhibidor de ALDHs (Keung *et al.*, 1993). La presencia de omeprazol hizo que la enzima fuera prácticamente insensible al efecto de la daidzina (Figura 7D), que interactúa con la enzima en el sitio de unión del aldehído, como se determina en la estructura de ALDH2 unida con el inhibidor (código PDB 2VLE; Lowe *et al.*, 2008). Nuestros datos confirman además que el activador está interactuando con el sitio de unión del aldehído. Para fortalecer este punto, se evaluó el efecto de la actividad de esterasa en presencia de la coenzima en la enzima activada y sin activación por omeprazol. En la enzima sin omeprazol, NAD⁺ incrementó la actividad de esterasa como se describió anteriormente (Ho *et al.*, 2005), pero en la enzima activada con omeprazol, la coenzima se comportó como un inhibidor competitivo (Figura 8).

Naturaleza de la unión al omeprazol

Con base en el mecanismo de acción reportado para la inhibición de omeprazol de la H⁺, K⁺/ATPasa gástrica, donde se generan compuestos reactivos de cisteínas (Morii *et al.*, 1989; Kalyanashis *et al.*, 2016), se planteó la hipótesis de que la unión

del omeprazol a ALDH1A1 podría ser covalente. Se probaron tres enfoques experimentales para dilucidar la naturaleza de la unión del omeprazol: dilución/concentración de proteínas, exposición a la temperatura y análisis de espectrometría de masas. La proteína se activó con omeprazol, luego se diluyó 10 veces con amortiguador y se concentró a un pequeño volumen usando filtros Amicon con corte de peso molecular de 50 kDa, el proceso se repitió dos veces más para alcanzar más de tres órdenes de magnitud de dilución de omeprazol. Después de este proceso, ALDH1A1 permaneció activada (Figura 9A), lo que sugirió que el omeprazol se encontraba unido covalentemente a la proteína.

El tratamiento con temperatura es una herramienta útil para evaluar la naturaleza de las interacciones proteína-ligando. Se incubó ALDH1A1 activada con omeprazol en amortiguador de fosfatos a 45 °C (esta temperatura no es suficiente para desnaturalizar a la proteína o afectar irreversiblemente la actividad, pero puede desestabilizar levemente la estructura), luego se retiraron alícuotas en diferentes momentos y se diluyeron 10 veces con amortiguador a 25 °C para ensayar la actividad. Curiosamente, después de 2 min de incubación a 45 °C, la enzima sufrió una desactivación, ya que la actividad volvió al nivel del control (Figura 9B). Un experimento más detallado de evaluación de la estabilidad a la temperatura de ALDH1A1 activado con omeprazol, mostró una tendencia leve pero no significativa a la protección de la enzima a temperaturas por debajo de 45 °C, pero a temperaturas más altas los perfiles de desnaturalización del control y la enzima activada eran idénticos.

Posteriormente, la enzima activada con omeprazol se sometió a un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, encontrando que la proteína exhibía un aumento en la masa del monómero equivalente a la del omeprazol. Sin embargo, en estas condiciones, se observó una pequeña fracción de proteína en la forma dimérica (recuadro Figura 9C), lo que indica que la enzima no estaba completamente desnaturalizada, este pico mostró un incremento en la masa de la proteína (dímero) correspondiente a dos moléculas de omeprazol, en comparación con el control (recuadro de la Figura 9C). Para asegurar la desnaturalización

completa, la proteína se trató con GdnHCl, luego se lavó con amortiguador de fosfatos y se sometió a análisis de espectrometría de masas. En este experimento los resultados no indicaron diferencias significativas entre la masa de la enzima activada con omeprazol y el control (Figura 9C). Después de estos resultados, se realizó un análisis de acoplamiento con la estructura rígida de omeprazol en el sitio activo de ALDH1, los resultados se muestran en la 1Figura 9D.

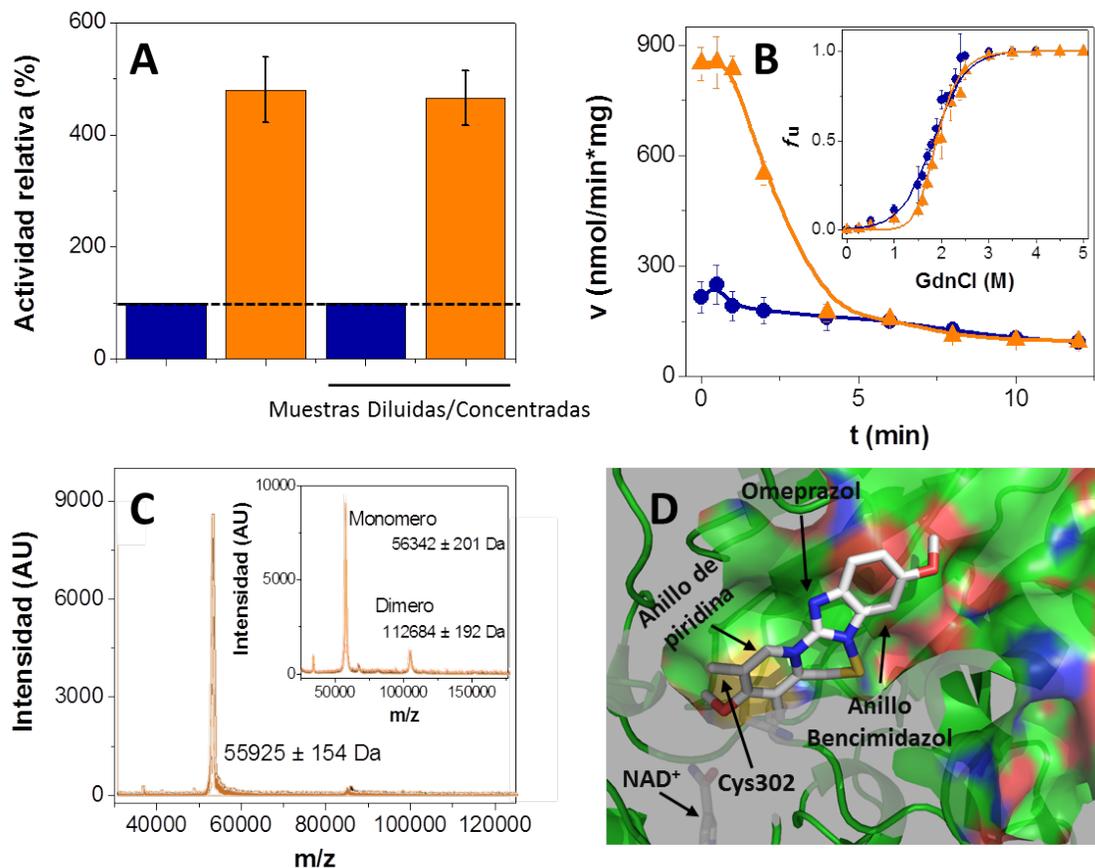


Figura 9. Evaluación de la naturaleza de unión del omeprazol a ALDH1A1. (a), Efecto de la dilución/concentración sobre la actividad de ALDH1A1 activada por omeprazol. (b) Efecto de la temperatura (45 °C) sobre ALDH1A1 activada con omeprazol (20 μ M); el inserto muestra el perfil de desnaturalización de GdnCl del control ALDH1A1 y el activado con omeprazol con el fin de obtener la máxima concentración de desnaturalización. (c), Análisis de espectrometría de masas de ALDH1A1 después de la activación con omeprazol con o sin desnaturalización por

GdnCl. El recuadro muestra los resultados de la espectrometría de masas de la enzima sin incubación con GdnCl. Los resultados son representativos de experimentos con tres preparaciones enzimáticas independientes. (D). Orientación propuesta de la estructura rígida de omeprazol en el sitio activo de ALDH1A1.

La prevalencia de la activación de la enzima después de la dilución/ concentración sugiere fuertemente que una vez que se completa el proceso de activación, el omeprazol permanece fuertemente unido a ALDH1A1. Sin embargo, el tratamiento con temperatura desactivó la enzima (Figura 9B), lo que sugiere que la exposición a la temperatura indujo una conformación más flexible de la proteína favoreciendo la liberación de omeprazol del sitio activo y su desactivación, estos datos sugieren que la unión del omeprazol a la enzima no es covalente.

Los experimentos de espectrometría de masas revelaron que la naturaleza de la unión del omeprazol a la proteína no es covalente. Como se muestra en la Figura 10, el ácido sulfénico formado tras el reacomodo de la estructura del omeprazol, puede sufrir una deshidratación adquiriendo la estructura de sulfonamida, que ya no es flexible. Por lo tanto, es posible que en el sitio activo de la enzima, donde las moléculas de agua son escasas, el intermediario sulfénico del omeprazol se deshidrate y la estructura rígida resultante quede atrapada irreversiblemente en el sitio activo (Figura 9D).

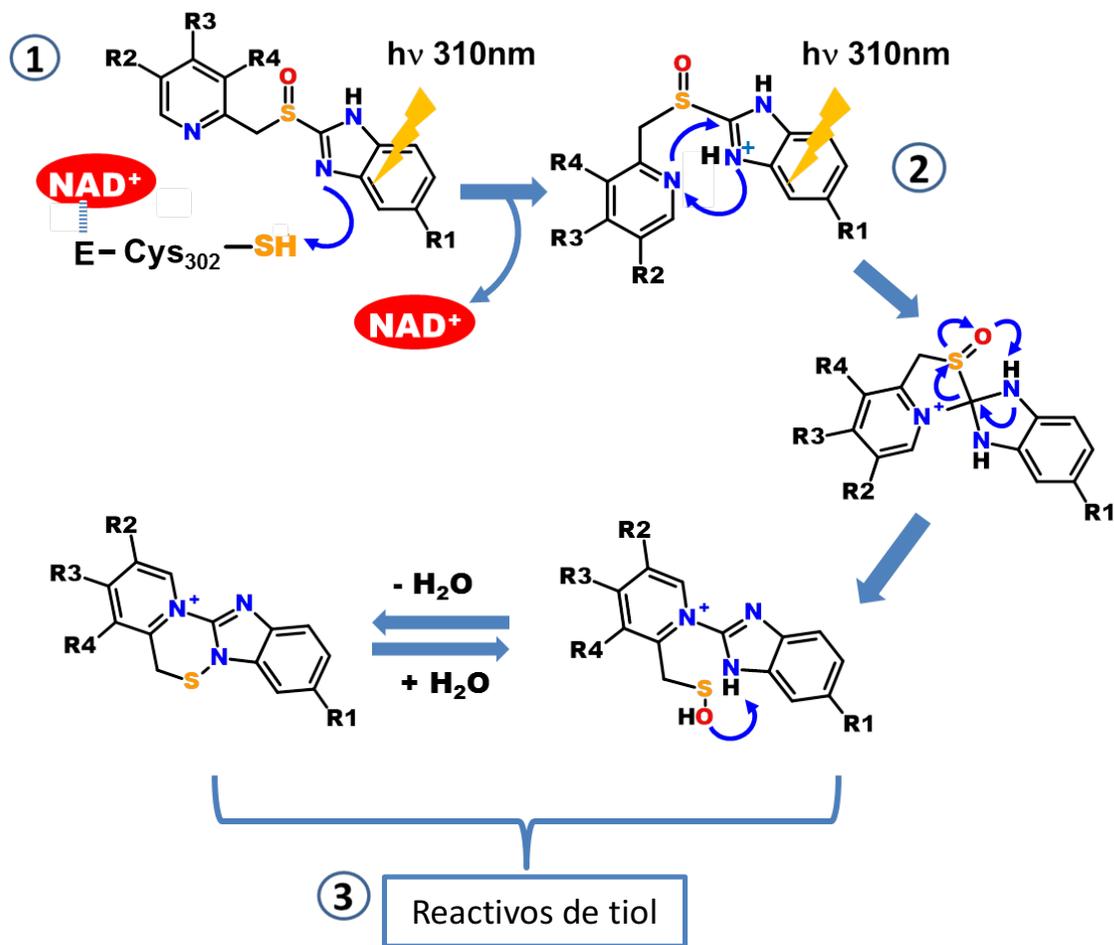


Figura 10. Mecanismo propuesto para la activación de ALDH1A1 por omeprazol. 1) La unión de la coenzima promueve una disminución del pK_a de la cisteína catalítica (C302) posteriormente el anillo de bencimidazol del omeprazol activado por luz extrae el protón de la C302; 2) El omeprazol sufre un reordenamiento molecular similar al inducido por un pH ácido; 3) Los productos finales intercambiables son reactivos de tiol, los cuales proponemos que se unen a la ALDH1A1, la estructura del producto generado tras la deshidratación en el sitio activo es la que creemos es el verdadero activador de la enzima.

Por otro lado, los datos de espectrometría de masas en ausencia de GdnHCl sugieren que los cuatro sitios activos de la enzima están ocupados por omeprazol, ya que se observan incrementos en la masa de la proteína equivalentes a una

molécula de omeprazol en la fracción monomérica y a dos moléculas de omeprazol en la fracción dimérica (recuadro, Figura 9C). Estos resultados sugieren que aunque la enzima posee la mitad de la reactividad de los sitios (Zhou *et al.*, 2000; Yoval-Sánchez *et al.*, 2013), todos los sitios están activos, porque todos los sitios son capaces de transformar y atrapar omeprazol. En un trabajo previo se separaron y estabilizaron los dímeros que componen al tetrámero de ALDH1A1 humana, determinando que las dos subunidades de los dímeros obtenidos estaban activas, ya que la magnitud de estallido de generación de NADH observada con esta enzima fue de 2 (Yoval-Sánchez *et al.*, 2013).

Protección de las células bacterianas del estrés oxidativo por omeprazol

Dado que los experimentos *in vitro* demostraron que el omeprazol era un potente activador de ALDH1A1 humana recombinante y protegía a la enzima de la inactivación por los aldehídos lipídicos (datos no mostrados), evaluamos si la presencia del activador podría proteger a las células de los efectos del estrés oxidativo. El modelo utilizado consistió en un cultivo de *E. coli* que expresa la ALDH1A1 humana, expuesto a la adición de un pulso de 20 mM H₂O₂ para generar estrés oxidativo. Las células se expusieron al estresor en 4 condiciones diferentes, como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que las células que no expresaban a la enzima dejaron de crecer inmediatamente después de la adición del pulso de H₂O₂. Se observó el mismo efecto en las células que expresaban la enzima, pero no se expusieron al omeprazol, y en los cultivos que expresaron ALDH1A1, se expusieron al omeprazol, pero no se expusieron a la luz para activar al fármaco (Figura 11A). Sin embargo, las células incubadas en las condiciones para la activación de omeprazol previas a la adición de H₂O₂, fueron protegidas del estrés generado (Figura 11A), ya que no hubo diferencia significativa con el crecimiento del cultivo del control sin ningún tratamiento previo y sin H₂O₂. Un análisis adicional del extracto de células protegidas por el tratamiento con omeprazol mostró una concentración disminuida de aldehídos lipídicos con respecto a las condiciones en las que las células no se

trataron con el fármaco (Figura 11B). Además, se evaluó la actividad de ALDH en extractos bacterianos de las diferentes condiciones. La actividad de ALDH disminuyó casi 10 veces en las células que expresaban la enzima recombinante, pero no fueron tratadas con omeprazol o fueron tratadas con omeprazol pero no activadas con luz, en correlación con el incremento en aldehídos lipídicos (Figura 11B). Sin embargo, la actividad de ALDH se conservó en las células protegidas por omeprazol (Figura 11C), en comparación con las células que expresaban ALDH1A1, pero no se sometieron al tratamiento de activación con omeprazol.

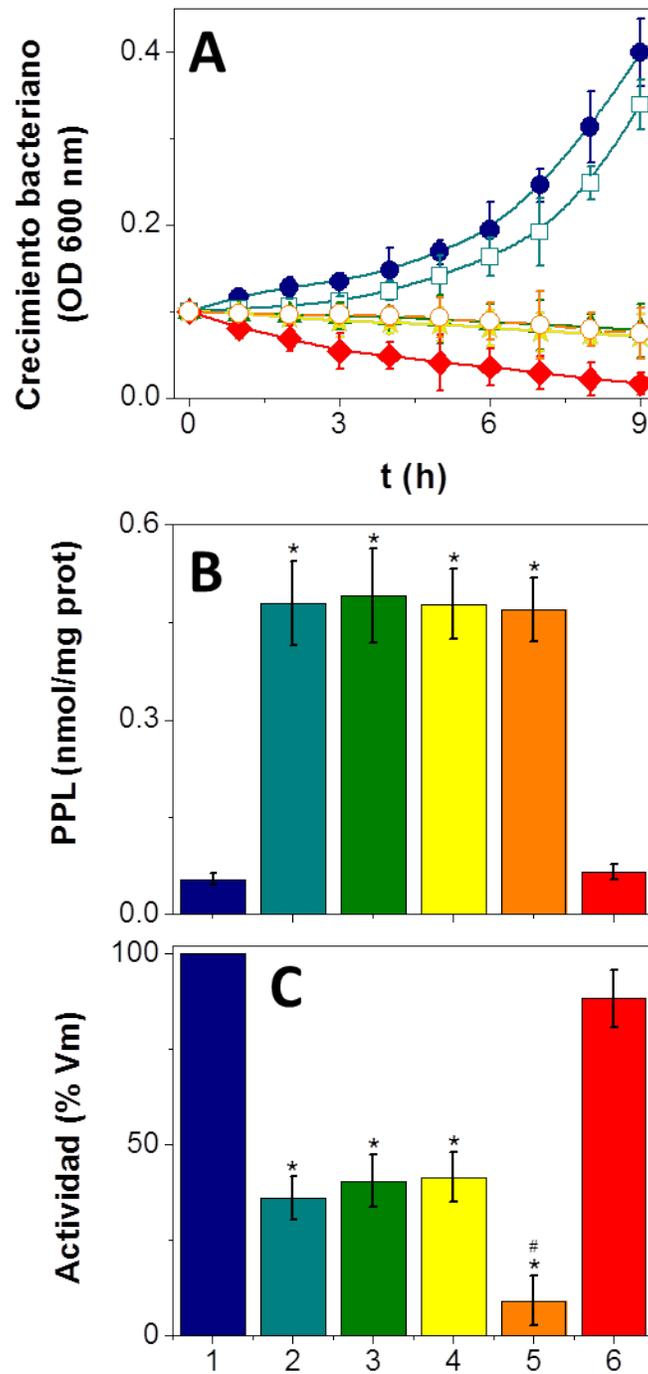


Figura 11. Efecto protector del omeprazol en células expuestas a estrés oxidativo. (A), Curvas de crecimiento de células de *E. coli* cultivadas en medio M9, que expresan ALDH1A1 humana y sometidas a diferentes condiciones como se detalla en la sección de materiales y métodos. (B) Niveles de aldehídos lipídicos en

extractos bacterianos; (C), actividad de ALDH en extractos bacterianos. En todas las condiciones ensayadas se adicionó el IPTG para sobre-expresar la ALDH1A1 a excepción de la condición 5 en donde éste no se adicionó. ●/(1), células sin tratamiento con omeprazol, en ausencia de H₂O₂, sin exposición a la luz; ○/(2), células sin tratamiento con omeprazol, expuestas a la luz y H₂O₂ 20 mM; ▲/(3), células incubadas con omeprazol 100 µM, sin exposición a la luz y en presencia de H₂O₂ 20 mM; ★/(4), células sin omeprazol y tratamiento con luz, expuestas a H₂O₂ 20 mM; ◆/(5), células incubadas sin IPTG (no expresan ALDH1A1), tratadas con omeprazol 100 µM, expuestas a la luz y en presencia de H₂O₂ 20 mM; □/(6), células incubadas con omeprazol 100 µM, expuestas a la luz y en presencia de H₂O₂ 20 mM. * p <0,001 respecto a 1 y 6; #p <0.01 vs 1-4, 6 (ANOVA con prueba post-hoc Scheffé).

El tratamiento con omeprazol protegió a las células bacterianas que sobre expresaban a la ALDH1A1 del estrés generado por la adición de H₂O₂. Esta protección bacteriana se correlacionó con una disminución en la concentración de aldehídos lipídicos y la preservación de la actividad de ALDH (Figura 11). La inactivación de la enzima en las células expuestas a las condiciones de estrés sin activación del omeprazol, puede ser el resultado de la exposición a altos niveles de aldehídos lipídicos promovidos por el pulso de H₂O₂ (Figura 11B), ya que anteriormente se reportó que ALDH1A1 es sensible a la inactivación por estos aldehídos (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012), sin embargo, no se descarta que esta inactivación de la enzima pueda ser producto de un mal plegamiento en la proteína o una expresión disminuida de la ALDH1A1. Estos resultados muestran que el omeprazol protegió a las células bacterianas de los efectos tóxicos de los aldehídos lipídicos generados durante el estrés oxidativo por la activación de ALDH1A1 y también por la protección de la enzima de la inactivación, lo que permitió la desintoxicación eficiente de estos compuestos tóxicos en la célula.

Efecto del omeprazol sobre la viabilidad de hepatocitos aislados y células AS-30D expuestas a estrés

Las células AS-30D se originaron del hígado de rata y al igual que los hepatocitos, se esperaba que las células AS-30D tuvieran una alta expresión basal de ALDH1A1, por lo que se evaluó la expresión de las principales isoformas de ALDH en AS-30D y hepatocitos aislados. Como se muestra en la figura 12A y 12B, las células AS-30D mostraron una expresión más alta de ALDH1A1 seguida de ALDH2 y en niveles más bajos de ALDH1A3 y ALDH3A1. Curiosamente, en los hepatocitos aislados, ALDH1A3 mostró la expresión más alta, seguida de ALDH2 y ALDH1A1 (Fig. 12A, 12B). Para el siguiente paso, las células AS-30D se expusieron a la generación de estrés oxidativo mediante la incubación con H₂O₂. El valor de LD₅₀ para H₂O₂ calculado para la viabilidad celular fue 75 ± 9 mM (n = 5) a una h de incubación (Fig. 12C). Se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar la concentración óptima de omeprazol al incubar las células y el tiempo de exposición a la luz, ya que previamente se determinó que el omeprazol requiere luz y la presencia de NAD⁺/NADH para activarse en el sitio activo de ALDH1A1. Se propuso que se requiere NAD⁺ (o NADH) para activar la cisteína catalítica al disminuir su valor de pKa, mientras que se necesita luz para activar el anillo de bencimidazol del omeprazol que extrae el protón del grupo sulfhidrilo de la cisteína catalítica, previamente activada por la unión de la coenzima. Después de la activación inicial por luz, el omeprazol sufre un reacomodo molecular similar al que ocurre en el ambiente ácido del estómago (Jana *et al.*, 2016), lo que hace que la sulfenamida tenga una estructura rígida que queda atrapada en el sitio activo de la enzima. La concentración óptima determinada para la incubación de células AS-30D con este compuesto fue de 100 μM, mientras que el tiempo de exposición a la luz para la activación de omeprazol fue de 10 min. Las células AS-30D en condiciones de control mostraron más del 90% de viabilidad después de una hora de incubación en amortiguador a 37 °C, mientras que las células expuestas a 75 mM de H₂O₂ mostraron aproximadamente un 50% de viabilidad (valor LD₅₀). En las células que fueron expuestas a la luz durante 10 min y luego a H₂O₂, también se determinó la viabilidad de aproximadamente el 50%, lo que

indicó que la exposición a la luz no afecta significativamente la viabilidad de las células (Figura 12D). Cuando las células se incubaron con omeprazol 100 μ M, se expusieron a la luz para activar el compuesto y luego se incubaron con H_2O_2 75 mM, la viabilidad fue similar a la del control; sin embargo, cuando las células se trataron con omeprazol sin exposición a la luz y se expusieron a H_2O_2 , la viabilidad observada fue solo de alrededor del 60%, que fue similar a las células tratadas solo con H_2O_2 . Estos resultados sugirieron que el metabolito activado del omeprazol es responsable de la protección celular del estrés inducido por H_2O_2 . El omeprazol es un inhibidor irreversible de la bomba de protones del estómago con un mecanismo ya descrito (Jana *et al.*, 2016). En el ambiente ácido del estómago, el omeprazol se protona y la estructura sufre un reacomodo para producir un ácido sulfénico que se puede estar intercambiando con un intermediario sulfenamida, ambos actúan como moléculas reactivas de grupos tiol. Estos intermediarios se unen irreversiblemente a la bomba de protones inhibiendo su actividad (Jana *et al.*, 2016). Propusimos que la activación de ALDH1A1 está relacionada con la generación de estos intermediarios reactivos de grupos tiol dentro del sitio activo de la enzima. Una vez que se forma el ácido sulfénico en el sitio activo, donde las moléculas de agua son escasas, se deshidrata formando una sulfenamida, que es una estructura rígida que queda atrapada en el sitio de unión del aldehído, modificando el entorno catalítico y provocando la activación de la enzima.

Por otro lado, las células se incubaron con disulfiram, un inhibidor de ALDH que *in vitro* puede formar un enlace disulfuro con dos de las cisteínas en el sitio activo de ALDH2, pero *in vivo* se metaboliza y su principal metabolito S-metil-N,N-dietiltiocarbamoil sulfona es responsable de la inhibición de las ALDHs, formando un enlace covalente con la cisteína reactiva (Veverka *et al.*, 1997; Ryzlak *et al.*, 1989; Lipsky *et al.*, 2001). Este experimento se realizó para evaluar el papel de las ALDHs en la protección observada. La concentración de disulfiram elegida (8 μ M) fue una que no afectó significativamente la viabilidad de las células (93.3%, n = 12; recuadro Figura 12C, círculos azules), pero inhibió en gran medida la actividad de ALDH (a 56.8%, P <0,001, n=12; recuadro de la Figura 12C, cuadrados rojos). Las células se incubaron con disulfiram en tres condiciones antes de la exposición

a H₂O₂: i) células incubadas solo con disulfiram; ii) células expuestas a omeprazol y luz para posteriormente incubarlas con disulfiram; y iii) células expuestas primero a disulfiram, luego a omeprazol y finalmente a la luz. Como era de esperar, bajo la primera condición, la viabilidad celular observada fue de 49.8%, (P <0,001, n=12; Figura 12D), debido a los efectos del H₂O₂. Sin embargo, bajo la segunda condición, la viabilidad celular fue de 78% (Figura 12D) por la protección provocada por omeprazol, pero bajo la tercera condición, en la que las células se incubaron primero con disulfiram, la viabilidad cayó a 45% (P <0.001, n=12; Figura 12D). Estos resultados sugieren que la protección encontrada bajo la segunda condición fue promovida por la activación de ALDH y la protección de la actividad de la enzima, ya que el metabolito que se genera a partir del omeprazol se une fuertemente al sitio activo en el sitio de unión del aldehído, evitando la unión subsecuente de disulfiram o su metabolito S-metil-N,N-dietiltiocarbamoil sulfona. Bajo la tercera condición, el disulfiram o su metabolito pueden unirse irreversiblemente a las cisteínas en el sitio catalítico (C301 y 302 numerados en ALDH1A1 y ALDH2; Veverka *et al.*, 1997; Ryzlak *et al.*, 1989; Lipsky *et al.*, 2001), evitando la activación y atrapamiento de omeprazol en el sitio activo de la enzima, favoreciendo la acumulación de aldehídos lipídicos y el daño celular tras la adición de H₂O₂.

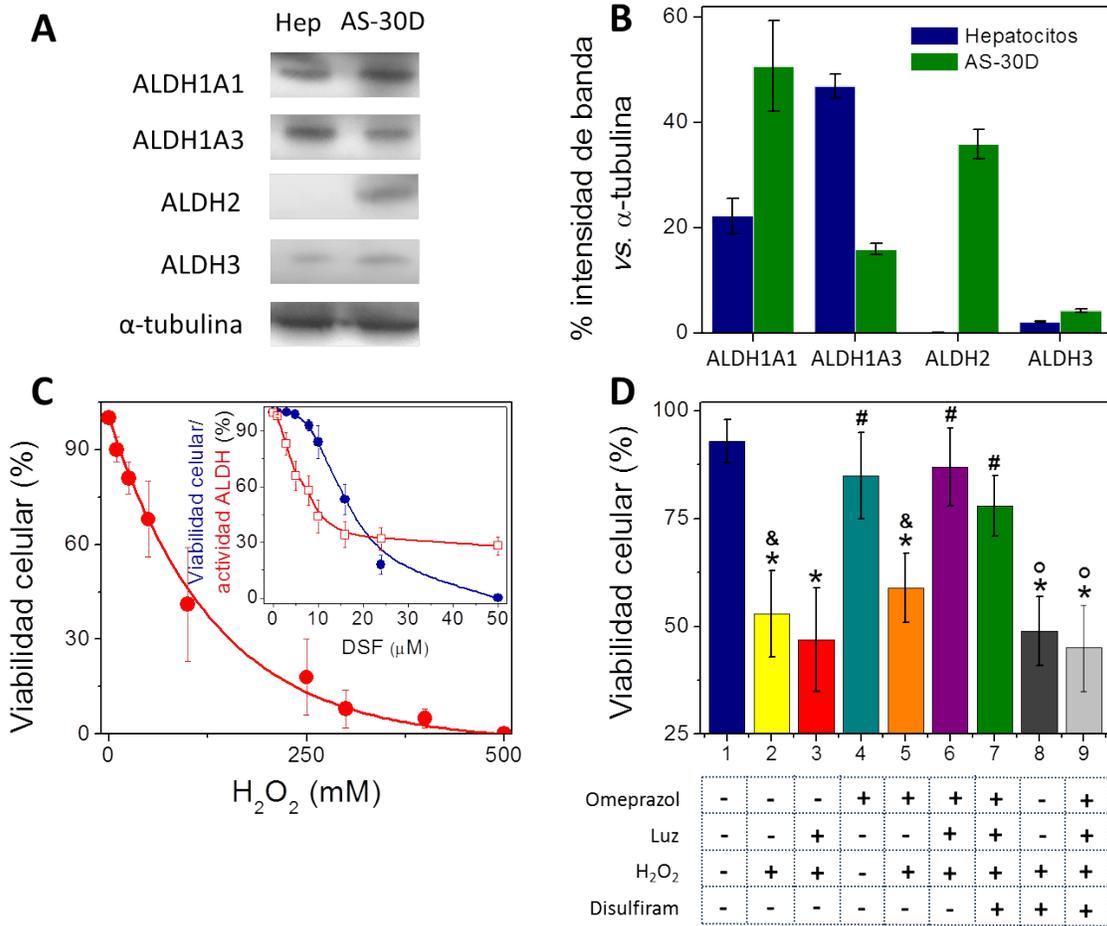


Figura 12. Expresión de las principales isoformas de ALDHs en hepatocitos y células AS30D, y efecto protector del omeprazol en células AS30D expuestas a H_2O_2 . (A) Western Blot representativo y (B) análisis densitométrico de la expresión de las isoformas de ALDH más comunes en hepatocitos aislados y preparaciones de células AS30D. (C) Determinación de la LD_{50} de las células AS-30D por H_2O_2 . El recuadro muestra la determinación de la LD_{50} de la viabilidad de las células AS-30D por disulfiram (círculos azules cerrados) y la inhibición de la actividad de ALDH por disulfiram (cuadrados rojos abiertos). (b) Viabilidad de las células AS-30D en diferentes condiciones; las barras están etiquetadas con números y el tratamiento correspondiente se indica debajo de cada barra. La diferencia entre las barras 7 y 9 es el orden en que se incubaron las células con los compuestos, en la condición 7 (en color verde) las células se incubaron primero con omeprazol, luego

se expusieron a la luz y finalmente se expusieron a disulfiram; en la condición 9 (en color gris claro) las células se incubaron primero con disulfiram, seguido de omeprazol y luego fueron expuestas a la luz. Los resultados son la media \pm DE de experimentos con 12 preparaciones celulares independientes. *p <0,001 frente a 1; # p <0,001 frente a 2; & p <0,001 frente a 4 y 6; *p <0,001 vs 7 (ANOVA con prueba post-hoc de Scheffé).

Actividad de enzimas antioxidantes

La superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) son parte de la barrera antioxidante, responsable de la desintoxicación de ROS en la célula. La exposición a H₂O₂ genera ROS en la célula y, por tanto, las enzimas antioxidantes se evaluaron en las condiciones descritas anteriormente. La actividad de estas enzimas no cambió significativamente bajo las condiciones ensayadas, con respecto al control cuando las células no fueron tratadas con H₂O₂ (Figura 13A-D). Los datos sugieren que estas enzimas no son inactivadas por los niveles de ROS generados por la adición de H₂O₂ en las condiciones evaluadas. No obstante, la viabilidad de AS-30D se vio gravemente afectada en estas condiciones. Recientemente, reportamos que al menos SOD es sensible a ROS, ya que la actividad de esta enzima se reduce significativamente por los niveles de ROS generados durante un evento de isquemia/reperfusión en el corazón de rata (Yoval-Sánchez *et al.*, 2020).

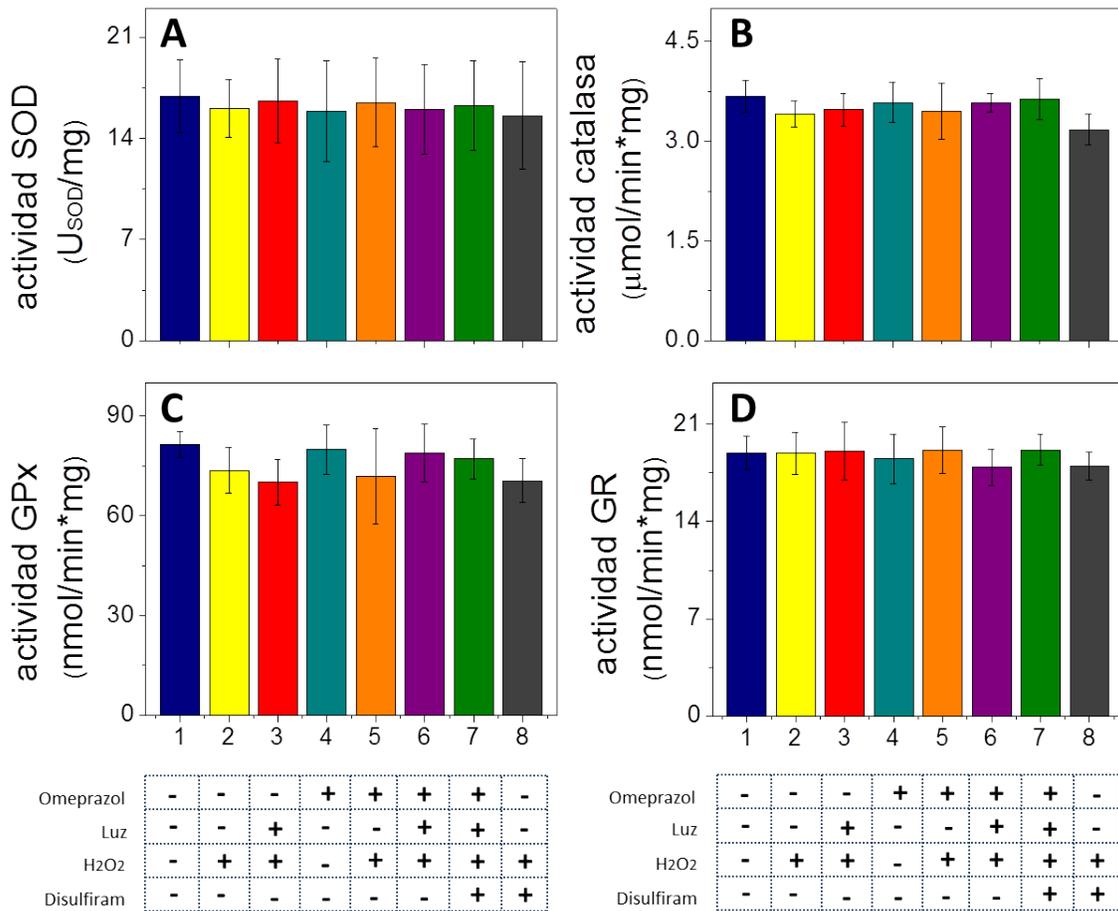


Figure 13. Actividad de enzimas antioxidantes en extractos de células AS-30D expuestas a diferentes condiciones. (A), SOD; (B), catalasa; (C) glutatión peroxidasa; (D) glutatión reductasa; Los resultados son la media \pm DE de experimentos con 12 preparaciones celulares independientes (ANOVA con prueba post-hoc de Scheffé).

Producción de aldehídos lipídicos, actividad de aldehído deshidrogenasas, glutatión S-transferasa (GST) y aconitasa.

Como indicador del daño oxidativo celular, se determinaron los niveles de subproductos de la peroxidación lipídica (LPP). Los niveles de LPP se triplicaron cuando las células fueron expuestas a H₂O₂ en comparación con el control. Sin

embargo, estos niveles disminuyeron casi a los niveles del control cuando las células se incubaron con omeprazol y se expusieron a la luz, antes de la adición de H₂O₂ (Figura 14A). Estos resultados concuerdan con la actividad de ALDHs, ya que esta actividad se conservó después de incubar las células con omeprazol y exponerlas a la luz y al H₂O₂ (Figura 14B). Cuando las células se incubaron con omeprazol, pero no se expusieron a la luz, y luego se expusieron a H₂O₂, la actividad de ALDH disminuyó a la mitad y los niveles de LPP se triplicaron. Estos niveles fueron similares a los observados en las células solo expuestas al H₂O₂, lo que nuevamente indica que la activación del omeprazol por la luz es esencial para la protección celular.

Previamente se reportó que algunas isoformas de ALDHs son susceptibles de inactivación por aldehídos lipídicos debido a las cisteínas adyacentes a la cisteína catalítica (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012). Como se indicó anteriormente, la incubación de las células con omeprazol y la exposición a la luz favorece la generación del metabolito activador que se une estrechamente al sitio activo de la enzima, por el sitio de unión del aldehído. Por lo anterior se propuso que en presencia del activador, los aldehídos altamente tóxicos ya no pueden formar aductos con las cisteínas en el sitio activo y la enzima permanece funcional para oxidar estos compuestos, disminuyendo su concentración en la célula. En la condición en la que las células se incubaron primero con omeprazol y se expusieron a la luz y luego se incubaron con disulfiram antes de la adición de H₂O₂, la concentración de LPP disminuyó significativamente y la actividad de ALDH se conservó. Por tanto, la unión de omeprazol impide la unión y reacción adicional del disulfiram o su metabolito S-metil-N,N-dietiltiocarbamoil sulfona con la cisteína reactiva; sin embargo, cuando las células se incubaron con disulfiram en primer lugar y luego con omeprazol, antes de la exposición a H₂O₂, los niveles de LPP aumentaron y la actividad de ALDH disminuyó significativamente (Figura 14A, 14B), debido a que el metabolito de disulfiram se une covalentemente a la cisteína catalítica de ALDH inactivándola (Lipsky *et al.*, 2001).

Al igual que la actividad de ALDH, la actividad de GST se vio comprometida cuando las células se expusieron a H_2O_2 y su actividad se restableció cuando las células se incubaron con omeprazol y se expusieron a la luz. Estos resultados sugieren que, al igual que la ALDH, la GST es susceptible a la inactivación por los aldehídos lipídicos y al disminuir la concentración de estos compuestos tóxicos, la actividad de esta enzima no se ve afectada (Figura 14D). En este sentido, se ha reportado que la GST humana es inhibida por aldehídos tóxicos como el 4-HNE, y en el sitio activo esta enzima posee residuos de cisteína, que podrían ser el blanco de la formación de aductos por estos aldehídos lipídicos (Bruns *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998). Otros posibles blancos de la formación de aductos por aldehídos lipídicos en la célula son Glc6PDH (Friguet *et al.*, 1994) e IDH-NADP⁺ (Yang *et al.*, 2004), que participan en la generación de NADPH para mantener el equilibrio redox citosólico y mitocondrial. La inhibición de estas enzimas por los aldehídos lipídicos también afectaría negativamente la generación de poder reductor en la célula, lo que provocaría la perturbación de la defensa antioxidante.

La aconitasa es un marcador de daño por estrés oxidativo debido a que esta enzima es sensible a los ROS por la presencia de centros Fe-S en el sitio activo (Castro *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2014). En la condición control, esta enzima mostró un valor de 15.4 nmol/min*mg, mientras que en las células expuestas a H_2O_2 , la actividad de la enzima se redujo a aproximadamente la mitad (Figura 14C). En las células protegidas por el tratamiento con omeprazol y luz antes de la exposición a H_2O_2 , la actividad de la aconitasa fue similar a la del control (Figura 14 C condición 6), pero cuando las células fueron expuestas al disulfiram antes del tratamiento con omeprazol y la posterior exposición a H_2O_2 , la actividad de esta enzima disminuyó significativamente en comparación con el control. Estos resultados indican que los niveles de estrés oxidativo disminuyeron cuando las células fueron sometidas al tratamiento protector con omeprazol y luz, antes de la exposición al H_2O_2 , debido a la desintoxicación más eficiente de los aldehídos lipídicos promovida por la protección de la actividad de las ALDHs.

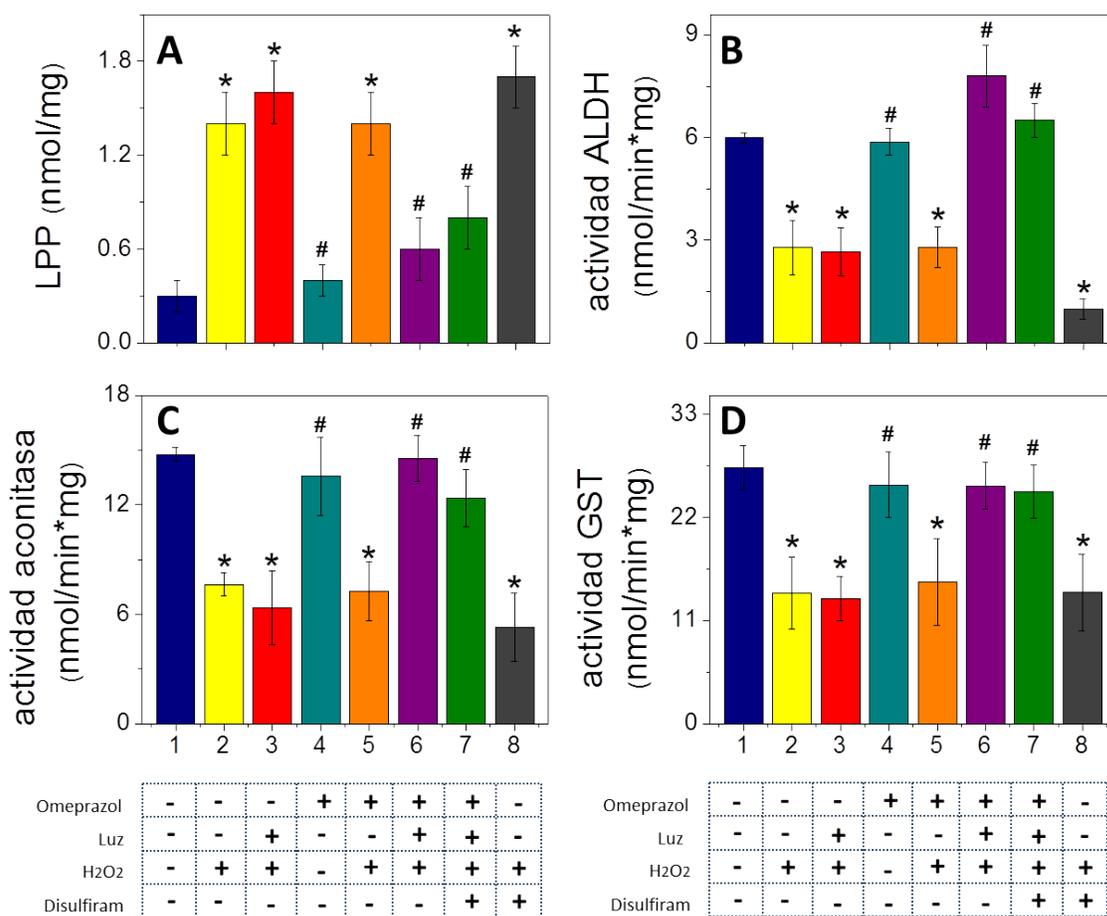


Figura 14. Generación de aldehídos lipídicos, actividades ALDHs y glutatión S-transferasa (GST) en el extracto de células AS-30D expuestas a diferentes condiciones. (A) Niveles de subproductos de la peroxidación lipídica. (B), actividad de ALDHs ($V_{max}=6$ nmol/min*mg). (C), actividad de aconitasa. (D), actividad de glutatión S-transferasa. Los resultados son la media \pm DE de experimentos con 12 preparaciones celulares independientes. * $p < 0,001$ frente a 1; # $p < 0,001$ vs 2, 3, 5 y 8 (ANOVA con prueba post-hoc de Scheffé).

Niveles de EROS en AS-30D

Después de la exposición al H₂O₂, los niveles de ROS en las células se duplicaron con respecto al control, mientras que cuando las células se incubaron con

omeprazol y se expusieron a la luz antes de la exposición al H_2O_2 , los niveles de ROS disminuyeron ligeramente con respecto a las células expuestas únicamente al H_2O_2 (Figura 15A). Cabe señalar que la incubación con omeprazol, sin exposición a la luz antes de la adición de H_2O_2 , no generó ninguna protección y los niveles de ROS fueron similares a la condición solo con H_2O_2 (Figura 15A, condición 3). Los radicales hidroxilo se pueden generar a partir de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton (Wardman *et al.*, 1996); por tanto, en las células tratadas con omeprazol y expuestas a H_2O_2 , los niveles de ROS no disminuyen a los niveles del control, porque en estas condiciones todavía se produciría la formación de radicales hidroxilo. El tratamiento con omeprazol no está dirigido a proteger contra la primera oleada de generación de ROS promovida por el H_2O_2 , sino a proteger contra la acumulación de aldehídos lipídicos y la generación posterior de ROS provocada por estos compuestos. Los aldehídos lipídicos como el 4-HNE inhiben los complejos I, II y III de la cadena respiratoria provocando la acumulación de intermediarios reducidos que pueden reaccionar con el oxígeno y promover una segunda oleada de producción de ROS (Hill *et al.*, 2009; Humphries *et al.*, 1998; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2019). Por otro lado, como control para determinar si la dihidroclorofluoresceína (DHCF) utilizada para monitorear la formación de ROS reaccionaría también con H_2O_2 , se incubó con esta en amortiguador con $FeCl_2$ para favorecer la reacción de Fenton *in vitro*. Se observó que la señal aumentaba alrededor de 200 veces con respecto a la condición en ausencia de $FeCl_2$, lo que indica que en estas condiciones experimentales la DHCF reacciona principalmente con radicales hidroxilo y no con especies menos reactivas como el H_2O_2 , sin embargo, no se descarta que la DHCF pueda estar reaccionando con otras especies como el superóxido o el mismo H_2O_2 (Figura 15B).

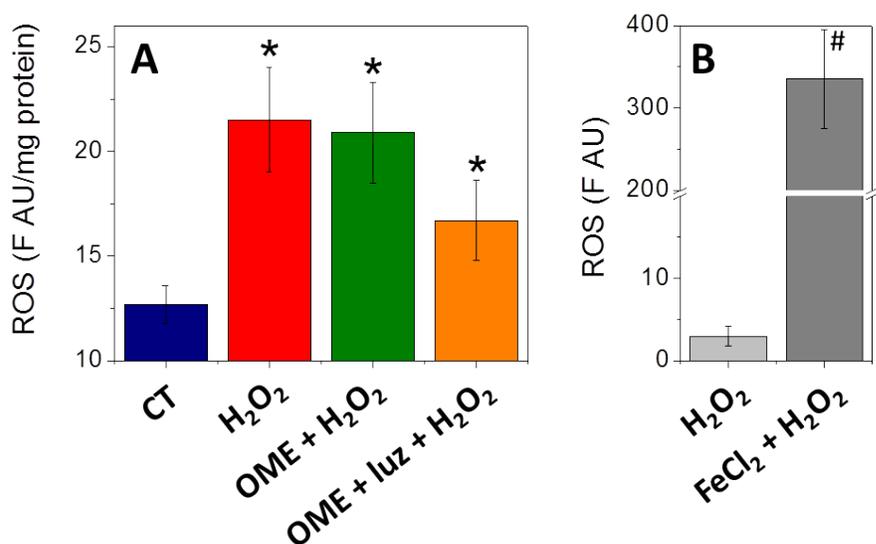


Figura 15. Efecto del omeprazol sobre la producción de ROS en células AS-30D. (A), niveles de ROS de células AS-30D en diferentes condiciones. (B), Determinación de la especificidad de la reacción de la dihidroclorofluoresceína (DHCF) con H₂O₂ y radical hidroxilo. La barra de color gris claro representa la señal de fluorescencia del DHCF con H₂O₂ en agua y la barra de color gris oscuro representa la señal de fluorescencia de la mezcla en presencia de 100 μM de FeCl₂. Los resultados son la media ± DE en experimentos con 12 preparaciones celulares independientes. * p <0,001 frente a CT, # p <0,001 frente a ausencia de FeCl₂.

Protección de los hepatocitos aislados del estrés oxidativo mediante el tratamiento con omeprazol

Las líneas de células cancerosas son más resistentes a condiciones estresantes que las células de cultivos primarios; por tanto, también se evaluaron los efectos principales del tratamiento con omeprazol en hepatocitos aislados de rata. Como se muestra en la Figura 16A, se obtuvo una LD₅₀ de 27.3 mM de H₂O₂ para la viabilidad de los hepatocitos aislados a una hora de incubación. Este valor de LD₅₀ es aproximadamente tres veces menor que el obtenido para las células cancerosas AS-30D. Similar a lo observado con AS-30D, después del tratamiento

con omeprazol y luz, la viabilidad de los hepatocitos expuestos a una adición de la concentración LD₅₀ de H₂O₂ se asemejaba a la del control, mostrando protección contra la agresión del H₂O₂ (Figura 16B). Los niveles de aldehídos lipídicos aumentaron casi tres veces en las células expuestas solo a H₂O₂ (Figura 16C), lo que se correlacionó con una disminución en la actividad de ALDH y el marcador de estrés oxidativo aconitasa (Figura 16D, E). Sin embargo, en las células tratadas con omeprazol y luz, los niveles de aldehídos lipídicos disminuyeron significativamente (P <0,001) (Figura 16C). Al mismo tiempo, se restauró la actividad de ALDH y aconitasa como en la condición control (Figura 16D, E). Estos resultados indican que los hepatocitos aislados también se protegen del estrés provocado por la acumulación de aldehídos lipídicos, debido a la activación de las ALDHs por el tratamiento con omeprazol. Como se muestra en la Figura 12A, 12B, la expresión de ALDH1A3 es mayor que la de ALDH1A1 en hepatocitos aislados. Entonces, ALDH1A3 además de ALDH1A1 puede tener un papel importante en la protección de estas células del estrés oxidativo, aunque no se han evaluado los efectos de activación y protección del tratamiento con omeprazol sobre la isoforma ALDH1A3 recombinante purificada hasta el momento.

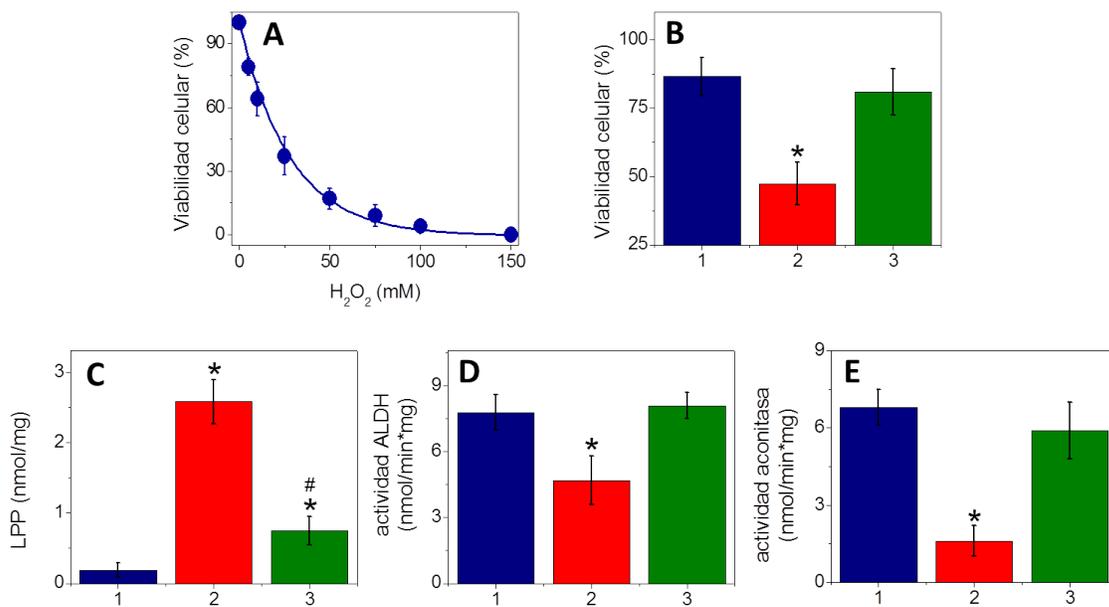


Figura 16. Efecto protector del omeprazol en hepatocitos aislados expuestos a H₂O₂. (A) Determinación de la LD₅₀ de la viabilidad de hepatocitos aislados, por H₂O₂. (B) Viabilidad de hepatocitos aislados en diferentes condiciones. La viabilidad mostrada en la figura fue normalizada respecto a la viabilidad obtenida antes de iniciar la exposición al H₂O₂ (100% = 60 ± 6% de viabilidad). (C) Niveles de subproductos de la peroxidación de lípidos; (D) actividad de ALDHs; y (E) actividad de aconitasa. Los códigos de color son los siguientes: Las barras azules muestran la condición control; las barras rojas representan la condición de incubación solo con H₂O₂; y las barras verdes muestran el efecto protector del tratamiento con omeprazol previo a la exposición con H₂O₂. Los resultados son la media ± DE de experimentos con 4 preparaciones de hepatocitos independientes. *p<0,001 respecto a 1 (prueba t de Student).

Protección de ALDH2 recombinante humana de la inactivación por aldehídos lipídicos por omeprazol

Dado que ALDH2 también se expresa a un nivel alto en las células AS-30D (Figura 12A), se decidió investigar el efecto del omeprazol sobre esta isoforma de ALDH. Como se mencionó anteriormente, las ALDHs son inactivadas por aldehídos insaturados y ALDH2 es la isoforma más susceptible a la inactivación (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012). Considerando que las mitocondrias son uno de los principales productores de ROS en la célula (Moreno-Sánchez *et al.*, 2013; Balaban *et al.*, 2005; Boveris *et al.*, 1972; Turrens 2003) y que ALDH2 es la isoforma mitocondrial, el proteger la actividad de esta enzima también sería importante para la desintoxicación de los aldehídos lipídicos generados en este organelo. Cuando se ensayó el efecto del omeprazol sobre la actividad de la ALDH2 humana recombinante con aldehídos lipídicos, se observó que la *V_m* con acroleína y 4-HNE como sustratos no cambiaba. Sin embargo, el valor de *K_i* para la inactivación de la enzima por estos compuestos tóxicos en la enzima activada con omeprazol aumentó 10 veces por acroleína y 100 veces por 4-HNE, respectivamente. Proponemos que aunque la unión del omeprazol a la enzima no

afecta la actividad de esta isoforma, este compuesto se modifica y queda atrapado en el sitio activo como en ALDH1A1, bloqueando el acceso de los aldehídos lipídicos a los residuos de cisteína adyacentes y a la cisteína catalítica, evitando la formación de aductos y volviendo a la enzima más resistente a la inactivación por estos compuestos tóxicos (Tabla 1 y Figura 17A, B). Además, otros aldehídos insaturados tales como 2-hexenal y 2-nonenal también producidos durante la oxidación de lípidos inactivan ALDH2 en concentraciones por debajo de 1 μM . Cuando se evaluó la actividad de ALDH2 con estos compuestos altamente tóxicos en ausencia de omeprazol, no se observó actividad incluso a concentraciones inferiores a 0,5 μM y después de la adición de una concentración saturante de propanal no se observó actividad residual, lo que indica que la enzima fue inactivada por estos aldehídos (Tabla 1). Sin embargo, la enzima tratada con omeprazol exhibió valores de V_m de 17 y 25 $\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ para 2-hexenal y 2-nonenal, respectivamente. Estos compuestos tóxicos todavía inactivaron ALDH2 en estas condiciones, pero a concentraciones más altas y los valores de K_i de la enzima para 2-hexenal y 2-nonenal fueron 490 ± 79 y 119 ± 14 μM , respectivamente (Tabla 1). Estos resultados muestran que aunque el omeprazol no aumenta la actividad de ALDH2, protege la enzima de la inactivación por los aldehídos lipídicos (Figura 17). Por lo tanto, la protección por omeprazol de ALDH2 de la inactivación por aldehídos lipídicos promovería la desintoxicación continua de estos compuestos en las mitocondrias. En este sentido, se ha reportado que el 4-HNE puede alcanzar concentraciones en el rango de 15-120 μM en condiciones patológicas (Balaban *et al.*, 2005; Boveris *et al.*, 1972; Turrens 2003; Copeland 2000; Lovell *et al.*, 1997), destacando la importancia de la protección de la enzima en este intervalo de concentración de aldehídos lipídicos. Estos resultados muestran que ALDH2 también participa en la protección celular del estrés oxidativo observado en los experimentos con las células AS-30D.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de ALDH2 humana con y sin tratamiento con omeprazol.

		Acroleína	4-HNE	2-hexenal	2-nonenal
Sin tratamiento con omeprazol	<i>K_m</i> (μ M)	1.3 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2		
	<i>V_m</i> (mU/mg)	272 \pm 23	109 \pm 18	ND	ND
	<i>K_i</i> (μ M)	23 \pm 4	7 \pm 3	< 0.1	< 0.1
Tratada con omeprazol (20 μ M) y luz	<i>K_m</i> (μ M)	1 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
	<i>V_m</i> (mU/mg)	258 \pm 28	92 \pm 12	17 \pm 2	25 \pm 4
	<i>K_i</i> (μ M)	641 \pm 76*	> 250*	490 \pm 79*	119 \pm 14*

* $p < 0.001$ vs sin omeprazol.

ND= no detectable (< 1nmol/min). mU= nmol/min. Los resultados se muestran como la media \pm DE en experimentos con 3 preparaciones independientes. (prueba de *t* de Student).

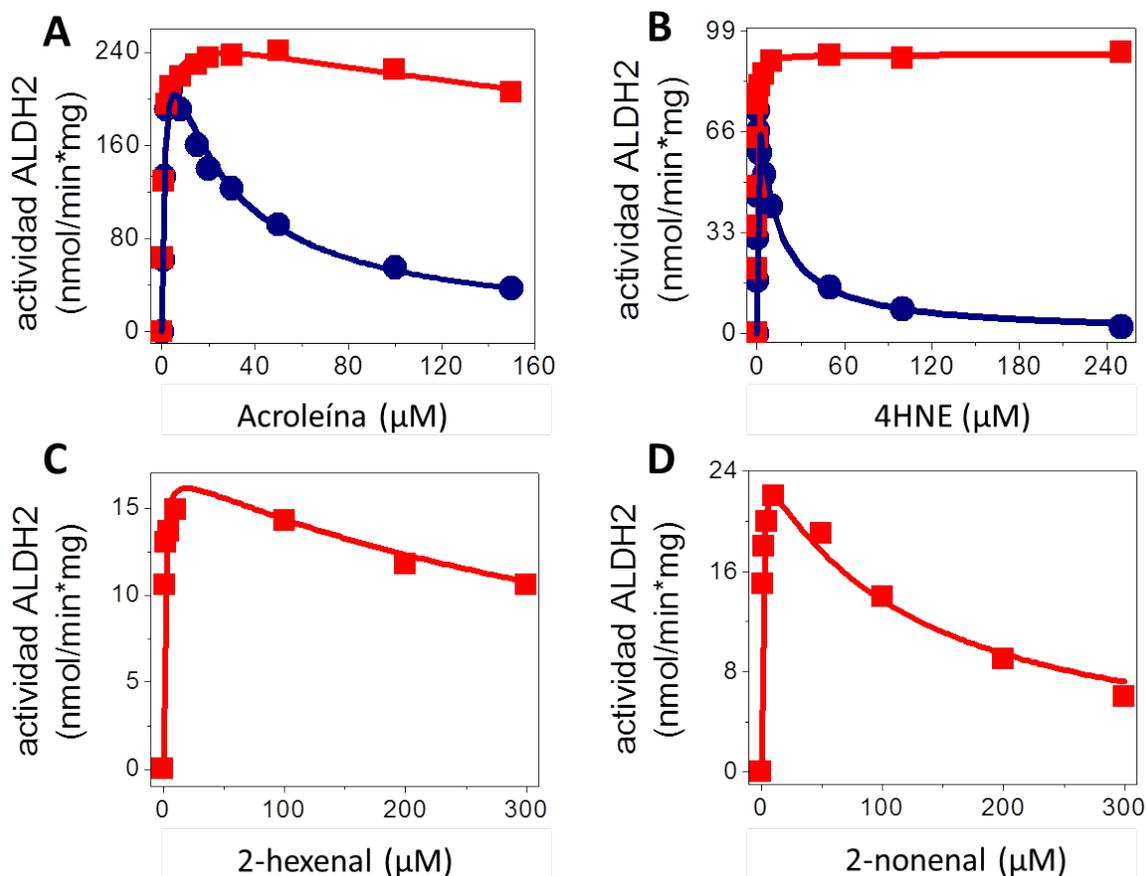


Figura 17. Protección de ALDH2 humana recombinante de la inactivación por aldehídos lipídicos por omeprazol. A y B, Perfiles cinéticos de ALDH2 humana con acroleína y 4-HNE. ●, actividad sin omeprazol y ■, actividad de la enzima después del tratamiento de activación con omeprazol 20 μM. C y D, perfil cinético de ALDH2 humana activada con omeprazol con 2-hexenal y 2-nonenal. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten. Los resultados son representativos de experimentos con 3 preparaciones enzimáticas independientes.

Evaluación de la función mitocondrial

Debido a la protección *in vitro* de ALDH2 observada, se decidió aislar la fracción mitocondrial de las células de los diferentes tratamientos para evaluar la función mitocondrial, midiendo la respiración y la formación de potencial electroquímico

transmembranal ($D\Psi_m$). Los resultados mostraron una disminución de aproximadamente la mitad en la respiración del estado 3 (relacionada con la síntesis de ATP), en las mitocondrias de las células incubadas con H_2O_2 con respecto a las mitocondrias de las células control, pero la velocidad de respiración se restauró en las mitocondrias de las células tratadas con omeprazol y luz, y posteriormente expuestas a H_2O_2 . La respiración en estado 4 mitocondrial no cambió en ninguna de las condiciones evaluadas. Sin embargo, cuando se evaluó el potencial máximo de respiración agregando el desacoplante del gradiente de protones mitocondrial CCCP, se observó que en las mitocondrias de células expuestas solo a H_2O_2 , la respiración en el estado 4 fue cinco veces menor que la del control. Lo anterior indica que los componentes de la cadena respiratoria también se dañaron en condiciones de estrés y que este daño se redujo mediante el tratamiento protector de las células con omeprazol antes de la exposición a H_2O_2 (Tabla 2). Estos resultados sugieren que la síntesis de ATP puede verse afectada al nivel de la ATP sintetasa o la adenina nucleótido translocasa, y que los complejos de la cadena respiratoria también se ven afectados (Tabla 2 y Figura 18A).

Cuando se evaluó la formación del potencial transmembranal ($\Delta\Psi_m$), se determinó que las mitocondrias de las células incubadas con H_2O_2 presentaban una menor capacidad de formación de $\Delta\Psi_m$ (Figura 18A). Esto último fue más evidente cuando se añadió una pequeña cantidad de ADP para estimular la síntesis de ATP. A diferencia del control, el pequeño colapso del gradiente de protones por la síntesis de ATP observado después de la adición de ADP no regresó al valor basal, después de que se agotó el ADP, lo que indica que estas mitocondrias estaban desacopladas o tenían muy baja capacidad de síntesis de ATP. En mitocondrias de células tratadas con el protocolo protector con omeprazol y luz recuperaron la capacidad de formación de $\Delta\Psi_m$ y la síntesis de ATP (Figura 18A y Tabla 2). Estos resultados indican que el tratamiento con el omeprazol protegió el sistema de la fosforilación oxidativa y los complejos respiratorios. En este sentido, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que los complejos respiratorios

I, III y IV, así como la ATP sintasa, son blancos de la formación de aductos por los aldehídos lipídicos (Chavez *et al.*, 2011; Choksi *et al.*, 2004; Doorn *et al.*, 2002).

También, se determinaron los niveles de aldehídos lipídicos en mitocondrias aisladas. Se observó que los aldehídos lipídicos aumentaron aproximadamente el doble en las mitocondrias de las células expuestas al H₂O₂. Sin embargo, estos niveles en las mitocondrias disminuyeron cuando las células fueron tratadas con omeprazol para activar las ALDHs, alcanzando niveles similares al de la condición control, en ausencia del agente estresor (Figura 18B). Los niveles bajos de aldehídos lipídicos en las mitocondrias de las células tratadas con omeprazol se correlacionaron con la recuperación de la formación de $\Delta\Psi_m$ y la capacidad de síntesis de ATP observadas (Figura 18A y B y Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de la función mitocondrial.

Condición	St 3 (ng oxygen atoms/min* mg)	St 4 (ng oxygen atoms/min*m g)	St 4 +CCCP (ng oxygen atoms /min*mg)	Control Respiratorio (St 3/St 4)	$\Delta\Psi_m$ (ΔF (AU))
Control	53 ± 4	14 ± 1	76 ± 6	3.8 ± 0.6	1.3 ± 0.2
H ₂ O ₂	25 ± 4*	14 ± 2	14 ± 2*	1.7 ± 0.4*	0.7 ± 0.1*
Omeprazol antes de H ₂ O ₂	57 ± 9	14 ± 2	69 ± 4	4 ± 0.8	1.2 ± 0.2

* $p < 0.001$ vs 1 (Prueba *t* de Student para muestras independientes).

St 3. Respiración mitocondrial en estado 3; St 4. Respiración mitocondrial en estado 4; $\Delta\Psi_m$, potencial electroquímico transmembranal. Las mitocondrias fueron aisladas de las células de los diferentes tratamientos descritos anteriormente en la

sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran como la media \pm SD de experimentos de mitocondrias aisladas de células de 6 preparaciones independientes para cada tratamiento.

La actividad de la aconitasa también se evaluó como marcador de daño por estrés oxidativo en preparaciones mitocondriales. La actividad de la aconitasa disminuyó en aproximadamente un 20% cuando las células se expusieron al estrés por H_2O_2 (Figura 18C). Sin embargo, esta actividad se restableció a los niveles del control cuando las células se incubaron con omeprazol y se expusieron a la luz. Finalmente, se evaluó la actividad de ALDH en las diferentes preparaciones mitocondriales. Se observó que la actividad de ALDH disminuyó alrededor de un 30-40% en comparación con el control, cuando las células se expusieron solo a H_2O_2 , pero cuando se incubaron con omeprazol y se expusieron a la luz, la actividad fue incluso mayor que la del control (Figura 18D). Esta observación puede sugerir que ALDH2 es más estable durante el proceso de aislamiento mitocondrial cuando está protegida por la unión de omeprazol. Cuando se evaluaron los niveles de producción de ROS, se observó que también aumentaban en las mitocondrias cuando las células se expusieron a H_2O_2 (Figura 18E) y eran ligeramente inferiores en las mitocondrias de las células protegidas por el tratamiento con omeprazol. Como se mencionó anteriormente, las ALDHs no desintoxican los ROS, sino que reducen los niveles de aldehídos lipídicos en la célula, evitando la segunda oleada de producción de ROS promovida por la acumulación de estos compuestos tóxicos. Finalmente, se midió la actividad de la malato deshidrogenasa (MDH) como un control para mostrar que los efectos sobre las actividades enzimáticas no eran el resultado de un daño mitocondrial generalizado. No se observaron cambios en la actividad de esta enzima entre las condiciones ensayadas (Figura 18F).

Como se mencionó anteriormente, la aconitasa es un marcador de estrés oxidativo y se ha reportado que cuando la viabilidad de las células disminuye al 50%, la

actividad de esta enzima disminuye en un 60-80% (Sheeran *et al.*, 2017; Dhanasekaran *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2014). El hecho de que la actividad de la aconitasa no se viera afectada de manera importante en las mitocondrias (Figura 18C) sugiere que la mayor parte del daño causado por el estrés oxidativo promovido por la adición de H₂O₂ ocurre fuera de las mitocondrias, afectando principalmente su periferia (membrana externa y espacio intermembranal), hacia donde se encuentran orientadas varias de las subunidades de los complejos respiratorios unidos a la membrana interna. Esta idea está sustentada por los resultados de la disminución de la capacidad de formación de $\Delta\Psi_m$ y la respiración mitocondrial de estado 3, además del hecho de que la actividad de ALDH2 (isoforma de la matriz mitocondrial) no se vio tan fuertemente afectada, considerando que esta enzima es muy sensible a los aldehídos lipídicos. Los resultados anteriores sugieren que el principal efecto protector de las células AS-30D en estos experimentos se produce por la activación de ALDH1A1 por parte del omeprazol, que promueve la disminución de los aldehídos lipídicos generados en el citosol, protegiendo el resto de los organelos.

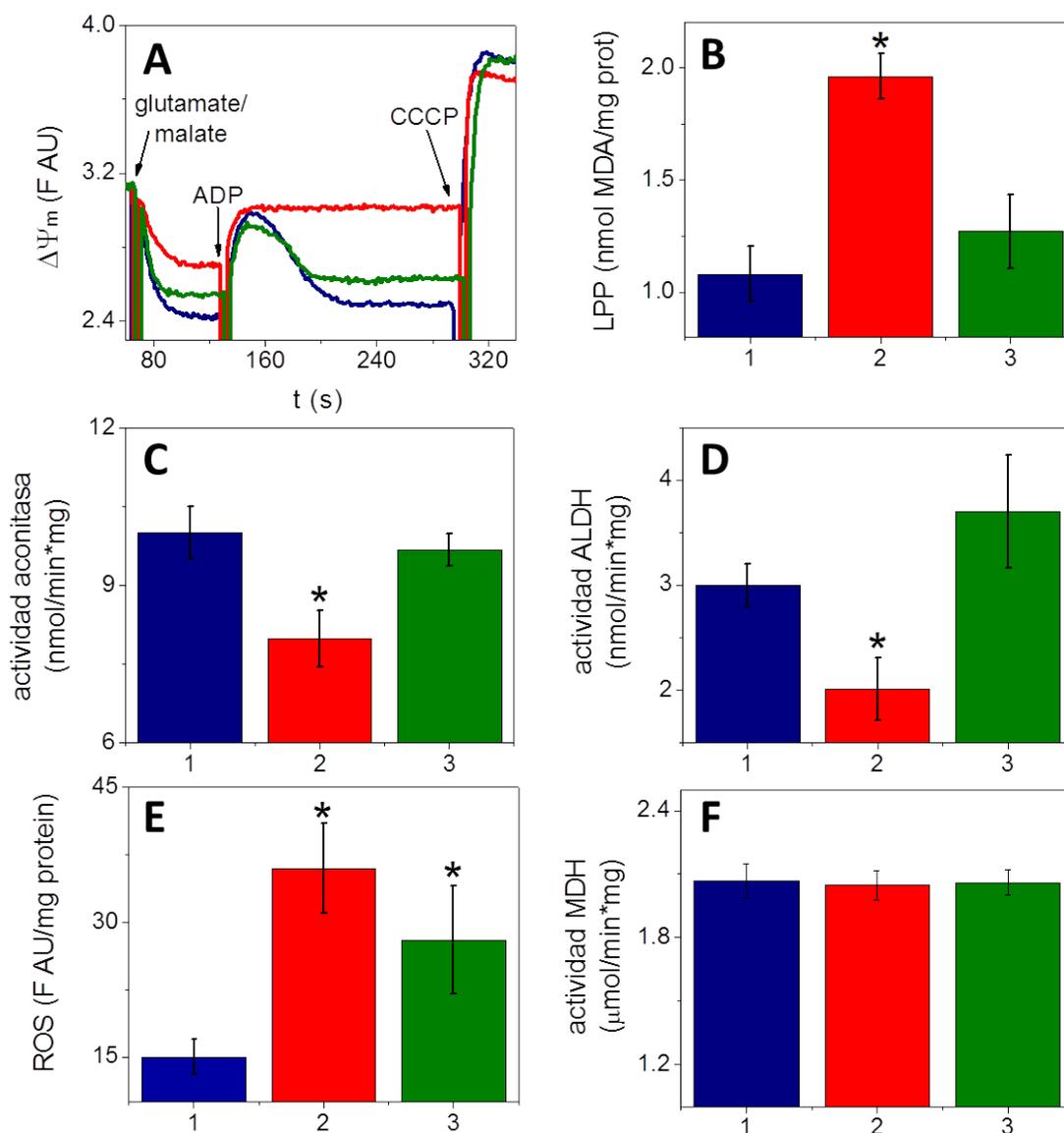


Figura 18. Actividad de ALDHs y marcadores de estrés oxidativo en mitocondrias aisladas de células de los diferentes tratamientos descritos para las células AS-30D. (A), formación de potencial transmembranal mitocondrial (F AU); (B) Niveles de subproductos de la peroxidación de lípidos; (C), actividad aconitasa; (D), actividad de ALDHs; (E), niveles de formación de ROS mitocondriales; y (F), actividad de malato deshidrogenasa. 1, las barras azules muestran la condición control; 2, las barras rojas representan la condición de incubación con H_2O_2 ; y 3, las barras verdes muestran la condición en presencia de omeprazol, expuesto a la

luz y al H₂O₂. Los resultados son la media ± DE en experimentos con mitocondrias aisladas de 12 preparaciones celulares independientes. *p <0,001 vs 1 (prueba de *t* de Student).

A pesar de las limitaciones que puede presentar el omeprazol para ser activado y proteger las células del estrés generado por H₂O₂, como es que la luz active el compuesto en el sitio activo de la enzima, en este trabajo aún fue posible activar el compuesto dentro de las células eucariotas, incluso dentro de las mitocondrias, promoviendo la protección de estas enzimas (ALDH1A1, ALDH2) y con él, la preservación de las mitocondrias y la integridad celular. El requerimiento de luz para la activación de omeprazol puede limitar el uso práctico de este compuesto para proteger el tejido en modelos más complejos de estrés oxidativo. A este respecto, el omeprazol se puede utilizar en tejidos que pueden exponerse directamente a la luz, por ejemplo, la aplicación tópica para proteger la piel o la aplicación líquida para proteger la córnea del ojo del daño por estrés oxidativo. En este sentido, en ratones, el efecto protector de la activación de ALDH por Alda-1 se ha explorado en un modelo de dermatitis inducida por radiación, y la aplicación tópica de Alda-1 (activador de ALDH1A1 y ALDH2) redujo significativamente la acumulación de aductos de 4-hidroxi-2-nonenal-proteína, retrasando la aparición de la dermatitis por radiación (Ning *et al.*, 2012). Sin embargo, se requiere más investigación para determinar el potencial del omeprazol en la protección de la célula del estrés oxidativo y para desarrollar protocolos adecuados para la liberación y activación del compuesto en modelos patológicos más complejos de tejidos y órganos, donde sería necesaria la iluminación *in situ* del tejido a proteger (tal vez utilizando fibra óptica).

Las concentraciones efectivas de omeprazol para la protección celular de 100 µM para AS-30D y hepatocitos obtenidas en este estudio, pueden parecer altas, pero para el tratamiento de gastritis en humanos, se emplean dosis orales de 20 a 40

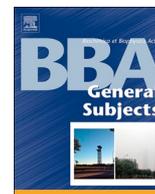
mg de este compuesto o sus derivados en adultos, alcanzando concentraciones plasmáticas de 400 a 800 μM después de 2-3 h (Noubarani *et al.*, 2010; Ochoa *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta estos datos, las concentraciones efectivas de omeprazol obtenidas para la protección celular del estrés oxidativo son de cuatro a ocho veces inferiores a las concentraciones utilizadas para el tratamiento de gastritis, por lo tanto, la reutilización de omeprazol para la protección celular del estrés oxidativo puede ser factible.

Conclusión

El omeprazol es el activador más potente de ALDH1A1 reportado hasta ahora ya que protege a las células bacterianas del daño por estrés oxidativo, debido a su capacidad de activar ALDH1A1 y proteger a la enzima de la inactivación por aldehídos tóxicos, generados por la peroxidación de lípidos. El omeprazol además de activar a la ALDH1A1, protege la actividad de la enzima, reduciendo la acumulación de aldehídos lipídicos en hepatocitos y células AS-30D, lo cual promueve la preservación de la función mitocondrial y la integridad celular después de la adición de H₂O₂. Los datos de este trabajo indican que las ALDH son un componente muy importante del sistema antioxidante, ya que si la actividad de estas enzimas se reduce en condiciones de estrés, la viabilidad de la célula se ve comprometida. Los resultados de este trabajo nos permiten proponer el reposicionamiento del omeprazol como activador de la ALDH que puede ser utilizado para el tratamiento de enfermedades que involucran episodios de estrés oxidativo para proteger las células y tejidos, disminuyendo el daño oxidativo.

Aunque la necesidad de exposición a la luz para activar el omeprazol en el sitio activo de la enzima puede parecer una limitación para el uso de este fármaco, como se muestra en la Figura 11, el omeprazol todavía puede activar ALDH1A1 dentro de las células. Sin embargo, para utilizar este activador en modelos más complejos de estrés oxidativo, como tejidos y órganos, se debe implementar una estrategia para activarlo *in situ* y, por lo tanto, se requiere más experimentación para explorar el potencial de omeprazol para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en modelos más complejos. Sin embargo, la estructura rígida de omeprazol propuesta como el verdadero activador de ALDH1A1 en este trabajo, puede servir como una estructura central para el diseño racional de nuevos activadores potentes de ALDH humanos.

Publicaciones derivadas del proyecto de investigación



Omeprazole as a potent activator of human cytosolic aldehyde dehydrogenase ALDH1A1



Luis Francisco Calleja^a, Javier Alejandro Belmont-Díaz^a, Oscar Medina-Contreras^b, Héctor Quezada^b, Belem Yoval-Sánchez^a, Jesús Campos-García^c, José Salud Rodríguez-Zavala^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico 14080

^b Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico 06720.

^c Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., Mexico 58030

ARTICLE INFO

Keywords:

ALDH1A1
Omeprazole
ALDH activator
Lipid aldehydes
Oxidative stress
4-HNE

ABSTRACT

Background: Accumulation of lipid aldehydes plays a key role in the etiology of human diseases where high levels of oxidative stress are generated. In this regard, activation of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) prevents oxidative tissue damage during ischemia-reperfusion processes. Although omeprazole is used to reduce stomach gastric acid production, in the present work this drug is described as the most potent activator of human ALDH1A1 reported yet.

Methods: Docking analysis was performed to predict the interactions of omeprazole with the enzyme. Recombinant human ALDH1A1 was used to assess the effect of omeprazole on the kinetic properties. Temperature treatment and mass spectrometry were conducted to address the nature of binding of the activator to the enzyme. Finally, the effect of omeprazole was evaluated in an *in vivo* model of oxidative stress, using *E. coli* cells expressing the human ALDH1A1.

Results: Omeprazole interacted with the aldehyde binding site, increasing 4–6 fold the activity of human ALDH1A1, modified the kinetic properties, altering the order of binding of substrates and release of products, and protected the enzyme from inactivation by lipid aldehydes. Furthermore, omeprazole protected *E. coli* cells over-expressing ALDH1A1 from the effects of oxidative stress generated by H₂O₂ exposure, reducing the levels of lipid aldehydes and preserving ALDH activity.

Conclusion: Omeprazole can be repositioned as a potent activator of human ALDH1A1 and may be proposed for its use in therapeutic strategies, to attenuate the damage generated during oxidative stress events occurring in different human pathologies.

1. Introduction

Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) conform a superfamily of enzymes that catalyze the irreversible oxidation of aldehydes to carboxylic acids [1]. These enzymes play a key role in the metabolism of toxic aldehydes produced in the cell during oxidative stress, such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA) [2] or those acquired from environmental exposure for instance formaldehyde, acrolein, acetaldehyde and benzaldehyde [3]. Aldehydes are strong

electrophilic compounds able to react with biomolecules such as proteins and DNA, compromising cell integrity and contributing to the etiology of various human diseases [4]. Due to their aldehyde detoxification capability, ALDHs are considered important elements of the cell defense against electrophilic damage and oxidative stress [5].

Human ALDH1A1 is a cytosolic homotetramer expressed in several tissues (skin, eyes, liver, kidney, testis and brain) [3,6]. This enzyme oxidizes a broad range of aliphatic and aromatic aldehydes including those formed endogenously such as retinals [7] and 3,4-

Abbreviations: Omeprazole, 6-Methoxy-2-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methylsulfanyl]-1H-benzimidazole; Alda-1, N-(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)-2,6-dichlorobenzamide; Alda-89, 5-Prop-2-enyl-1,3-benzodioxole; ALDHs, aldehyde dehydrogenases; ALDH1A1, human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1; ALDH2, human aldehyde dehydrogenase class 2; ALDH3A1, human aldehyde dehydrogenase 3 family member A1; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; MDA, malondialdehyde; GdnHCl, guanidine hydrochloride; p-NPA, 4-nitrophenyl acetate.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, Mexico City, Mexico 14080

E-mail address: rodjos@cardiologia.org.mx (J.S. Rodríguez-Zavala).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129451>

Received 31 May 2019; Received in revised form 30 September 2019; Accepted 23 October 2019

Available online 31 October 2019

0304-4165/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Activation of ALDH1A1 by omeprazole reduces cell oxidative stress damage

Luis Francisco Calleja¹, Belem Yoval-Sánchez¹, Luz Hernández-Esquivel¹,
Juan Carlos Gallardo-Pérez¹, Marcela Sosa-Garrocho², Álvaro Marín-Hernández¹ ,
Ricardo Jasso-Chávez¹, Marina Macías-Silva² and José Salud Rodríguez-Zavala¹ 

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez', Ciudad de México, México

² Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Keywords

4-HNE; ALDHs; lipid aldehydes; omeprazole; oxidative stress

Correspondence

J. S. Rodríguez-Zavala, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, 'Ignacio Chávez', Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, Ciudad de México, México
E-mails: jose.zavala@cardiologia.org.mx, rzjs@yahoo.com

(Received 30 July 2020, revised 30 November 2020, accepted 4 January 2021)

doi:10.1111/febs.15698

Under physiological conditions, cells produce low basal levels of reactive oxygen species (ROS); however, in pathologic conditions ROS production increases dramatically, generating high concentrations of toxic unsaturated aldehydes. Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) are responsible for detoxification of these aldehydes protecting the cell. Due to the physiological relevance of these enzymes, it is important to design strategies to modulate their activity. It was previously reported that omeprazole activation of ALDH1A1 protected *Escherichia coli* cells overexpressing this enzyme, from oxidative stress generated by H₂O₂. In this work, omeprazole cell protection potential was evaluated in eukaryotic cells. AS-30D cell or hepatocyte suspensions were subjected to a treatment with omeprazole and exposure to light (that is required to activate omeprazole in the active site of ALDH) and then exposed to H₂O₂. Cells showed viability similar to control cells, total activity of ALDH was preserved, while cell levels of lipid aldehydes and oxidative stress markers were maintained low. Cell protection by omeprazole was avoided by inhibition of ALDHs with disulfiram, revealing the key role of these enzymes in the protection. Additionally, omeprazole also preserved ALDH2 (mitochondrial isoform) activity, diminishing lipid aldehyde levels and oxidative stress in this organelle, protecting mitochondrial respiration and transmembrane potential formation capacity, from the stress generated by H₂O₂. These results highlight the important role of ALDHs as part of the antioxidant system of the cell, since if the activity of these enzymes decreases under stress conditions, the viability of the cell is compromised.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are formed as by-products of oxygen metabolism in the cell (Scheme 1). When the concentration of ROS increases in the cell

due to oxidative stress, it triggers lipid peroxidation, where hydroxyl radical (OH[•]) or hydroperoxyl radical ([•]HO₂) attacks methylene groups (-CH₂-) adjacent to

Abbreviations

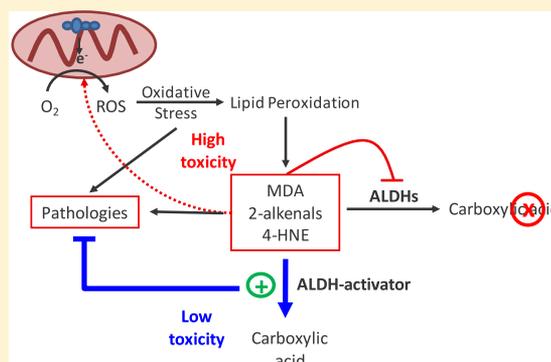
ALDHs, aldehyde dehydrogenases; ALDH1A1, human aldehyde dehydrogenase 1 family member 1A1; ALDH2, human aldehyde dehydrogenase 2; ALDH1A3, aldehyde dehydrogenase 1 family member A3; ALDH3A1, aldehyde dehydrogenase 3 family member A1; AS-30D, rat ascites hepatoma cells; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone; DHCF, dihydrochlorofluorescein; DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione S-transferase; GR, glutathione reductase; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; LPP, lipid peroxidation by-products; SOD, superoxide dismutase.

Role of Aldehyde Dehydrogenases in Physiopathological Processes

José Salud Rodríguez-Zavala, Luis Francisco Calleja, Rafael Moreno-Sánchez, and Belem Yoval-Sánchez*[✉]

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México 14080, México

ABSTRACT: Many different diseases are associated with oxidative stress. One of the main consequences of oxidative stress at the cellular level is lipid peroxidation, from which toxic aldehydes may be generated. Below their toxicity thresholds, some aldehydes are involved in signaling processes, while others are intermediaries in the metabolism of lipids, amino acids, neurotransmitters, and carbohydrates. Some aldehydes ubiquitously distributed in the environment, such as acrolein or formaldehyde, are extremely toxic to the cell. On the other hand, aldehyde dehydrogenases (ALDHs) are able to detoxify a wide variety of aldehydes to their corresponding carboxylic acids, thus helping to protect from oxidative stress. ALDHs are located in different subcellular compartments such as cytosol, mitochondria, nucleus, and endoplasmic reticulum. The aim of this review is to analyze, and highlight, the role of different ALDH isoforms in the detoxification of aldehydes generated in processes that involve high levels of oxidative stress. The ALDH physiological relevance becomes evident by the observation that their expression and activity are enhanced in different pathologies that involve oxidative stress such as neurodegenerative disorders, cardiopathies, atherosclerosis, and cancer as well as inflammatory processes. Furthermore, ALDH mutations bring about several disorders in the cell. Thus, understanding the mechanisms by which these enzymes participate in diverse cellular processes may lead to better contend with the damage caused by toxic aldehydes in different pathologies by designing modulators and/or protocols to modify their activity or expression.



INTRODUCTION

The number of reports involving the participation of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the etiology of different diseases has increased in recent years, highlighting the importance of these enzymes in the cell. In humans, 19 functional protein-coding genes of ALDHs have been described. These enzymes are widely distributed in the organism, playing different roles according to their specificity for substrates, and are critical for certain physiological and pathological processes, since they regulate the concentration of aldehydes in the cell by oxidizing them to the corresponding less reactive and more soluble acids in a NAD(P)^+ -dependent reaction. By preventing the accumulation of aldehydes derived from endogenous or exogenous processes, ALDHs mitigate oxidative damage at the cellular and tissue levels.^{1,2}

Diverse isoforms of ALDHs are able to detoxify aldehydes generated as byproducts of lipoperoxidation (Figure 1), such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE), malondialdehyde (MDA), and acrolein with different degrees of specificity, preventing or attenuating the cell damage generated by these molecules. However, ALDHs may become inactivated by lipid aldehydes. Indeed, the susceptibility to lipid peroxidation byproducts of three human ALDH isoforms (ALDH1A1, ALDH2, and ALDH3A1) was recently reported.³ It was observed that ALDH3A1 was insensitive to inactivation when exposed to high concentrations of these aldehydes ($\geq 300 \mu\text{M}$ HNE and $\geq 20 \text{mM}$ acrolein), while ALDH1A1 and

ALDH2, which have high catalytic efficiencies with these compounds, were inactivated at low concentrations ($\leq 10 \mu\text{M}$). The differences in susceptibility to lipid aldehydes correlated with the content of cysteines (Cys) in the catalytic site, since ALDH3A1 only has the catalytic Cys, while ALDH1A1 and ALDH2 have 1 and 2 Cys adjacent to the catalytic Cys, respectively. Thus, adducts formation, and the consequent inactivation, is favored in these last two isoforms.³

ALDHs inactivation may interfere with the efficient detoxification of lipid aldehydes, promoting their accumulation, which may trigger reactive oxygen species (ROS) production and then further lipoperoxidation, amplifying oxidative damage in the cell (Figure 2). In this regard, it has been established that mutations in ALDHs genes leading to defective aldehydes metabolism are the molecular basis of several diseases, including γ -hydroxybutyric aciduria, pyridoxine-dependent seizures, Sjögren–Larson syndrome, type II hyperprolinemia, and may even contribute to the etiology of complex diseases including cancer, Parkinson's and Alzheimer's.²

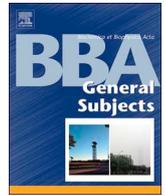
It has been determined that an ALDH2 polymorphism where glutamate at position 487 is replaced by a lysine

Special Issue: Redox Pathways in Chemical Toxicology

Received: September 3, 2018

Published: January 10, 2019

Otras publicaciones



Piperlonguminine a new mitochondrial aldehyde dehydrogenase activator protects the heart from ischemia/reperfusion injury

Belem Yoal-Sánchez, Luis Francisco Calleja, María de la Luz Hernández-Esquivel, José Salud Rodríguez-Zavala*

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Ciudad de México, 14080, México

ARTICLE INFO

Keywords:

PPLG
Aldehyde dehydrogenases
ALDH2
Ischemia/reperfusion
Lipoperoxidation
4-HNE
Cardioprotection

ABSTRACT

Background: Detoxification of aldehydes by aldehyde dehydrogenases (ALDHs) is crucial to maintain cell function. In cardiovascular diseases, reactive oxygen species generated during ischemia/reperfusion events trigger lipoperoxidation, promoting cell accumulation of highly toxic lipid aldehydes compromising cardiac function. In this context, activation of ALDH2, may contribute to preservation of cell integrity by diminishing aldehydes content more efficiently.

Methods: The theoretic interaction of piperlonguminine (PPLG) with ALDH2 was evaluated by docking analysis. Recombinant human ALDH2 was used to evaluate the effects of PPLG on the kinetics of the enzyme. The effects of PPLG were further investigated in a myocardial infarction model in rats, evaluating ALDHs activity, anti-oxidant enzymes, oxidative stress markers and mitochondrial function.

Results: PPLG increased the activity of recombinant human ALDH2 and protected the enzyme from inactivation by lipid aldehydes. Additionally, administration of this drug prevented the damage induced by ischemia/reperfusion in rats, restoring heart rate and blood pressure, which correlated with protection of ALDHs activity in the tissue, a lower content of lipid aldehydes, and the preservation of mitochondrial function.

Conclusion: Activation of ALDH2 by piperlonguminine ameliorates cell damage generated in heart ischemia/reperfusion events, by decreasing lipid aldehydes concentration promoting cardioprotection.

1. Introduction

During ischemia/reperfusion events an imbalance of blood supply and metabolic demand is generated [1], causing tissue injury and cell death by inducing the production of high levels of ROS [2,3] and the subsequent production and accumulation of lipid aldehydes. As a result of the high demand of production of ATP, heart is the organ with the highest consumption of oxygen in the body. This organ consumes approximately 8–15 mL O₂ min/100 g tissue and this O₂ requirement can increase up to 70 mL/100 g tissue during exercise. In basal physiological conditions, 1–2% O₂ consumed by mitochondrial respiratory chain is transformed to superoxide anion, but under pathological conditions this proportion substantially increases [4]. Thus, the heart is highly susceptible to damage by reactive oxygen species generated in different pathologies [5,6]. Cardiovascular diseases involve the

production of elevated concentrations of lipid aldehydes by lipid peroxidation. One of the most abundant and reactive lipid aldehydes is 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). This compound is formed when free radicals attack ω-6 polyunsaturated fatty acids such as linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acids in the membrane [7,8]. The toxicity of 4-HNE is related to its electrophilic nature, since it can react with the nucleophilic groups of amino acids with the following order of potency Cys > > Hys > Lys [9], interfering with the function of several proteins in the cell and producing damage.

Although aldehyde dehydrogenases (ALDHs) main function is aldehydes detoxification, these enzymes are also targets of inactivation by lipid aldehydes. In this regard, ALDH2 a mitochondrial matrix enzyme mainly expressed in heart, brain and kidney [10], has high catalytic efficiency with 4-HNE, but is also the most sensitive isoform to inactivation by this compound [9,11]. It has been observed that 4-HNE-

Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; AMI, acute myocardial infarction; DMSO, dimethyl sulfoxide; DSF, disulfiram; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; 4-HHE, 4-hydroxy-2-hexenal; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; IR, ischemia/reperfusion; MDH, malate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; PPLG, piperlonguminine; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarboturic acid reactive substances; TTC, triphenyl tetrazolium chloride.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, Ciudad de México 14080, México.

E-mail address: rodjos@cardiologia.org.mx (J.S. Rodríguez-Zavala).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129684>

Received 18 February 2020; Received in revised form 1 July 2020; Accepted 9 July 2020

Available online 14 July 2020

0304-4165/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Referencias bibliográficas.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. (2005) 120(4), 483-495.

Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *Jornal of Clinical Periodontology*. (2002) 29(3), 189-194.

Belmont-Díaz JA, Calleja-Castañeda LF, Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. Tamoxifen, an anticancer drug, is an activator of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*. (2015) 83(1), 105-116.

Belmont-Díaz JA, Yoval-Sánchez B, Calleja-Castañeda LF, Pardo-Vázquez JP, Rodríguez-Zavala JS. Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS Journal*. (2016) 283(19), 3637-3650.

Bennett AF, Buckley PD, Blackwell LF. Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions. *Biochemistry*. (1983) 22(4), 776-784.

Bennett AF, Buckley PD, Blackwell LF. Proton release during the pre-steady-state oxidation of aldehydes by aldehyde dehydrogenase. Evidence for a rate-limiting conformational change. *Biochemistry*. (1982) 21(18), 4407-4413.

Blackwell LF, Motion RL, MacGibbon AK, Hardman MJ, Buckley PD. Evidence that the slow conformation change controlling NADH release from the enzyme is rate-limiting during the oxidation of propionaldehyde by aldehyde dehydrogenase. *The Biochemical Journal*. (1987) 242(3), 803-808.

Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. *British Medical Bulletin*. (1987) 43(2), 371-385.

Boesch JS, Lee C, Lindahl RG. Constitutive expression of class 3 aldehyde dehydrogenase in cultured rat corneal epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*. (1996) 271(9), 5150-5157.

Boveris A, Oshino N, Chence B. The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*. (1972) 128(3), 617-630.

Bruns CM, Hubatsch I, Ridderstrom M, Mannervik B, Tainer JA. Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology*. (1999) 288(3), 427-439.

Calleja-Castañeda LF. Identificación de los residuos implicados en la inactivación de las ALDHs humanas por los productos de la peroxidación lipídica. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 2015.

Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *European Journal of Dentistry*. (2009) 3(2), 100-106.

Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Ickes BR, Petersen DR. Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (2005) 315(1), 8-15.

Castro L, Tórtora V, Mansilla S, Radi R. Aconitase: non-redox iron-sulfur proteins sensitive to reactive species. *Accounts of Chemical Research*. (2019) 52(9), 2609-2619.

Chavez JD, Wu J, Bisson W, Maier CS. Site-specific proteomic analysis of lipoxidation adducts in cardiac mitochondria reveals chemical diversity of 2-alkenal adduction. *Journal of Proteomics*. (2011) 74(11), 2417-2429.

Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. (2008) 321(5895), 1493-1495.

Chen H, Juchau MR. Inhibition of embryonic retinoic acid synthesis by aldehydes of lipid peroxidation and prevention of inhibition by reduced glutathione and glutathione S-transferases. *Free Radical Biology and Medicine*. (1998) 24(3), 408-417.

Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation Research*. (2014) 114(3), 524-537.

Chen Z, Stamler JS. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends in Cardiovascular Medicine*. (2006) 16(8), 259-265.

Choksi KB, Boylston WH, Rabek JP, Widger WR, Papaconstantinou J. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2004) 1688(2), 95-101.

Copeland RA. Deviations from hyperbolic kinetics. In *enzymes a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. (2000) (Copeland RA, ed), pp. 137-141. John Wiley & sons Inc., New York, NY.

Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysical Acta*. (2013) 1830(5), 3217-3266.

Dhanasekaran A, Kotamraju S, Joseph J, Kalyanaraman B. Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*. (2005) 39(5), 567-583.

Dickinson FM, Hart GJ. Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *The Biochemical Journal*. (1982) 205(2), 443-448.

Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European Journal of Biochemistry*. (1994) 220(3), 645-661.

Doorn JA, Petersen DR. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chemical Research in Toxicology*. (2002) 15(11), 1445-1450.

Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry*. (2000) 267(14), 4315-4324.

Eaton P, Li JM, Hearse DJ, Shattock MJ. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *The American Journal of Physiology*. (1999) 276(3 Pt 2), H935-H943.

Eisenthal R, Danson MJ, Hough DW. Catalytic efficiency and *k_{cat}/K_m*: a useful comparator? *Trends in Biotechnology*. (2007) 25(6), 247-249.

Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *British Medical Bulletin*. (1993) 49(3), 566-576.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (1993) 57(5 Suppl), 779S-785S.

Feldman RI, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. I. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. (1972) 247(1), 260-266.

Feldman RI, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. (1972) 247(1), 267-272.

Ford WC. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. (2004) 10(5), 387-399.

Friguet B, Stadtman ER, Szweda LI. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *The Journal of Biological Chemistry*. (1994) 269(34), 21639-21643.

Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L. ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiology of Disease*. (2003) 14(3), 637-647.

González-Segura L, Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Muñoz-Clares RA. Residues that influence coenzyme preference in the aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interaction*. (2015) 234, 59-74.

Greabu M, Battino M, Totan A, Mohora M, Mitrea N, Totan C, Spinu T, Didilescu A. Effect of gas phase and particulate phase of cigarette smoke on salivary antioxidants. What can be the role of vitamin C and pyridoxine? *Pharmacological Reports*. (2007) 59(5), 613-618.

Hempel J, Bühler R, Kaiser R, Holmquist B, de Zalenski C, von Wartburg JP, Vallee B, Jörnvall H. Human liver alcohol dehydrogenase. 1. The primary structure of the beta 1 beta 1 isoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. (1984) 145(3), 437-445.

Hempel J, Nicholas H, Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Science*. (1993) 2(11), 1890-1900.

Hempel J, von Bahr-Lindström H, Jörnvall H. Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. (1984) 141(1), 21-35.

Hill BG, Dranka BP, Zou I, Chatman JC, Darley-Usmar VM. Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *The Biochemical Journal*. (2009) 424(1), 99-107.

Ho KK, Allali-Hassani A, Hurley TD, Weiner H. Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry*. (2005) 44(22), 8022-8029.

Horton RM, Cai Z, Ho SM, Pease LR. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. (2013) 54(3), 129-133.

Hsu LC, Chang WC, Yoshida A. Cloning of a cDNA encoding human ALDH7, a new member of the aldehyde dehydrogenase family. *Gene*. (1994) 151(12), 285-289.

Humphries KM, Yoo Y, Szewda LI. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. (1998) 37(2), 552-557.

Jana K, Bandyopadhyay T, Ganguly B. Revealing the mechanistic pathway of acid activation of proton pump inhibitors to inhibit the gastric proton pump: a DFT study. *The Journal of Physical Chemistry B*. (2016) 120(51), 13031-13038.

Johnson CT, Bosron WF, Harden CA, Li TK. Purification of human liver aldehyde dehydrogenase by high-performance liquid chromatography and identification of isoenzymes by immunoblotting. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. (1987) 11(1), 60-65.

Kaneko T, Tahara S, Taguchi T, Kondo H. Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. *Mutation Research*. (2001) 487(12), 19-30.

Keung WM, Vallee BL. Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. (1993) 90(4), 1247-1251.

Khanna M, Chen CH, Kimble-Hill A, Parajuli B, Perez-Miller S, Baskaran S, Kim J, Dria K, Vasiliou V, Mochly-Rosen D, Hurley TD. Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*. (2011) 286(50), 43486-43494.

King G, Holmes R. Human ocular aldehyde dehydrogenase isozymes: distribution and properties as major soluble proteins in cornea and lens. *The Journal of Experimental Zoology*. (1998) 282(1-2), 12-17.

Kitson TM. The activation of aldehyde dehydrogenase by diethylstilbestrol and 2,2-dithiopyridine. *The Biochemical Journal*. (1982) 207(1), 81-89.

Klyosov AA, Rashkovetsky LG, Tahir MK, Keung WM. Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry*. (1996) 35(14), 4445-4456.

Klyosov AA. Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry*. (1996) 35(14), 4457-4467.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*. (2010) 48(5), 425-435.

Larson HN, Zhou J, Chen Z, Stamler JS, Weiner H, Hurley TD. Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: roles of residues 475 and 487. *The Journal of Biological Chemistry*. (2007) 282(17), 12940-12950.

Lassen N, Bateman JB, Estey T, Kuszak JR, Nees DW, Piatigorsky J, Duester G, Day BJ, Huang J, Hines LM, Vasiliou V. Multiple and additive functions of

ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-) knock-out mice. *The Journal of Biological Chemistry*. (2007) 282(35), 25668-25676.

Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Seminars in Cell Developmental Biology*. (2008) 19(2), 100-112.

Lipsky JJ, Shen ML, Naylor S. Overview-in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chemico-Biological Interaction*. (2001) 132(1), 81-91.

Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R, Hempel J, Wang BC. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural Biology*. (1997) 4(4), 317-326.

Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markesbery WR. Elevated 4-hydroxy-nonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. (1997) 18(5), 457-461.

Lowe ED, Gao GY, Johnson LN, Keung WM. Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Journal of Medicinal Chemistry*. (2008) 51(15), 4482-4487.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal*. (1999) 13(10), 1169-1183.

Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2013) 1830(5), 3143-3153.

Łuczaj W, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular and Molecular Biology Letters*. (2003) 8(2), 391-413.

Łuczaj W, Waszkiewicz E, Skrzydlewska E, Roszkowska-Jakimiec W. Green tea protection against age-dependent ethanol-induced oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. (2004) 67(7), 595-606.

MacGibbon AK, Buckley PD, Blackwell LF. Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase. *The Biochemical Journal*. (1977) 165(3), 455-462.

Maeda M, Hasumura Y, Takeuchi J. Localization of cytoplasmic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase isozymes in human liver. *Journal of Technical Methods and Pathology*. (1988) 59(1), 75-81.

Mann CJ, Weiner H. Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Science*. (1999) 8(10), 1922-1929.

Marchal S, Branlant G. Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*. (1999) 38(39), 12950-12958.

Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacological Reviews*. (2007) 59(2), 125-150.

Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*. (1998) 6(12), 1541-1551.

Moreno-Sánchez R, Hernández-Esquivel L, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Neuzil J, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. Reactive oxygen species are

generated by the respiratory complex II-evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *The FEBS Journal*. (2013) 280(3), 927-938.

Morii M, Takata H, Takeguchi N. Acid activation of omeprazole in isolated gastric vesicles, oxyntic cells, and gastric lands. *Gastroenterology*. (1989) 96(6), 1453-1461.

Muñoz-Clares RA, González-Segura L, Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A. Amino acid residues that affect the basicity of the catalytic glutamate of the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interaction*. (2015) 234, 45-58.

Ni L, Zhou J, Hurley TD, Weiner H. Human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: three-dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms. *Protein Science*. (1999) 8(12), 2784-2790.

Ning S, Budas GR, Churchill EN, Chen CH, Knox SJ, Mochly-Rosen D. Mitigation of radiation-induced dermatitis by activation of aldehyde dehydrogenase 2 using topical alda-1 in mice. *Radiation Research*. (2012) 178(1), 69-74.

Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell and Environment*. (2012) 35(2), 454-484.

Northrop DB. Rethinking fundamentals of enzyme action. *Advances in Enzymology Related Areas of Molecular Biology*. (1999) 73, 25-55.

Noubarani M, Keyhanfar F, Motevalian M, Mahmoudian M. Improved HPLC method for determination of four PPIs, omeprazole, pantoprazole, lansoprazole and rabeprazole in human plasma. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. (2010) 13(1), 1-10.

Ochoa D, Roman M, Cabaleiro T, Sainz-Rodríguez M, Mejía G, Abad-Santos F. Effect of food on the pharmacokinetics of omeprazole, pantoprazole and rabeprazole. *BMC Pharmacology & Toxicology*. (2020) 21(1), 54.

Papazafiropoulou A, Skliros E, Sotiropoulos A, Papafragos C, Gikas A, Apostolou O, Kaliora H, Tountas C. Prevalence of target organ damage in hypertensive subjects attending primary care: C.V.P.C. study (epidemiological cardio-vascular study in primary care). *BMC Family Practice*. (2011) 12, 75.

Pappa A, Brown D, Koutalos Y, DeGregori J, White C, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. (2005) 280(30), 27998-28006.

Pappa A, Chen C, Koutalos Y, Townsend AJ, Vasiliou V. Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*. (2003) 34(9), 1178-1189.

Pappa A, Estey T, Manzer R, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immune-histochemical localization in the cornea. *The Biochemical Journal*. (2003) 376(Pt 3), 615-623.

Pérez-Navero JL, Benítez-Sillero JD, Gil-Campos M, Guillén-del Castillo M, Tasset I, Túnez I. Cambios en biomarcadores del estrés oxidativo inducidos por la pubertad [Changes in oxidative stress biomarkers induced by puberty]. *Anales de Pediatría*. (2009), 70(5), 424-428.

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Hurley TD. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural and Molecular Biology*. (2010) 17(2), 159-164.

Ratcliff MA, Dane AJ, Williams A, Ireland J, Luecke J, McCormick RL, Voorhees KJ. Diesel particle filter and fuel effects on heavy-duty diesel engine emissions. *Environmental Science and Technology*. (2010) 44(21), 8343-8349.

Reddy GB, Khandare AL, Reddy PY, Rao GS, Balakrishna N, Srivalli I. Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. *Toxicological Sciences*. (2003) 72(2), 363-368.

Rodríguez-Zavala J, Weiner H. Role of the C-terminal tail on the quaternary structure of aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. (2001) 132(1-3), 151-160.

Rodríguez-Zavala JS, Allali-Hassani A, Weiner H. Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. *Protein Science*. (2006) 15(6), 1387-1396.

Rodríguez-Zavala JS, Calleja LF, Moreno-Sánchez R, Yoval-Sánchez B. Role of aldehydes dehydrogenases in physiopathological processes. *Chemical Research in Toxicology*. (2019) 32(3), 405-420.

Ryzlak MT, Pietruszko R. Human brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, succinic semialdehyde dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isozymes: substrate specificity and sensitivity to disulfiram. *Alcoholism, clinical and experimental research*. (1989) 13(6), 755-761.

Sastre J, Martín JA, Gómez-Cabrera MC, Pereda J, Borrás C, Pallardó FV, Viña J. Age-associated oxidative damage leads to absence of gamma-cystathionase in over 50% of rat lenses: relevance in cataractogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. (2005) 38(5), 575-582.

Segel IH. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Willy Classics Library. 1993.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal*. (2001) 360, 1-16.

Sheeran FL, Pepe S. Mitochondrial bioenergetics and dysfunction in failing heart. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (2017) 982. 65-80.

Stachowicz A, Olszanecki R, Suski M, Glombik K, Basta-Kaim A, Adamek D, Korbut R. Proteomic analysis of mitochondria-enriched fraction isolated from the

frontal cortex and hippocampus of apolipoprotein E knockout mice treated with Alda-1, an activator of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *International Journal of Molecular Science*. (2017) 18(2), 435.

Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*. (1997) 5(5), 701-711.

Takahashi K, Weiner H. Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites. *The Journal of Biological Chemistry*. (1980) 255(17), 8206-8209.

Tapia E, Sánchez-Lozada LG, García-Niño WR, García E, Cerecedo A, García-Arroyo FE, Osorio H, Arellano A, Cristóbal-García M, Loredó ML *et al.* Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I. *Free Radical Research*. (2014) 48(11), 1342-1354.

Tappel AL. The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1953) 44(2), 378-395.

Thoma I, Krischke M, Loeffler C, Mueller MJ. The isoprostanoïd pathway in plants. *Chemistry and Physics of Lipids*. (2004) 128(1-2), 135-148.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. (2003) 552(Pt 2), 335-344.

Vallari RC, Pietruszko R. Interaction of Mg²⁺ with human liver aldehyde dehydrogenase. I. Species difference in the mitochondrial isozyme. *The Journal of Biological Chemistry*. (1984) 259(8), 4922-4926.

Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions*. (2000) 129(1-2), 1-19.

Veverka KA, Johnson KL, Mays DC, Lipsky JJ, Naylor S. Inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and its metabolite methyldiethylthiocarbamoyl-sulfoxide. *Biochemical Pharmacology*. (1997) 53(4), 511-518.

Wang MF, Han CL, Yin SJ. Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. (2009) 178(1-3), 36-39.

Wang X, Weiner H. Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. (1995) 34(1), 237-243.

Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiation Research*. (1996) 145(5), 523-531.

Weiner H, Hu JH, Sanny CG. Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. (1976) 251(13), 3853-3855.

Westphal GA, Krahl J, Munack A, Rosenkranz N, Schröder O, Schaak J, Pabst C, Brüning T, Bünger J. Combustion of hydrotreated vegetable oil and jatropha methyl ester in a heavy duty engine: emissions and bacterial mutagenicity. *Environmental Science and Technology*. (2013) 47(11), 6038-6046.

Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*. (2012) 33(12), 656-668.

Xu T, Liu S, Ma T, Jia Z, Zhang Z, Wang A. Aldehyde dehydrogenase 2 protects against oxidative stress associated with pulmonary arterial hypertension. *Redox Biology*. (2017) 11, 286-296.

Yan J, De Melo J, Cutz JC, Aziz T. Aldehyde dehydrogenase 3A1 associates with prostate tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. (2014) 110(10), 2593-2603.

Yang JH, Yang ES, Park JW. Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by lipid peroxidation products. *Free Radical Research*. (2004) 38(3), 241-249.

Yoval-Sánchez B, Calleja LF, Hernández-Esquivel MH, Rodríguez-Zavala JS. Piperlonguminine a new mitochondrial aldehyde dehydrogenase activator protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*. (2020) 1864(11), 129684.

Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts. *Chemical Research in Toxicology*. (2012) 25(3), 722-729.

Yoval-Sánchez B, Pardo JP, Rodríguez-Zavala JS. New insights into the half-of-the-sites reactivity of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*. (2013) 81(8), 1330-1339.

Zhang T, Zhao Q, Ye F, Huang CY, Chen WM, Huang WQ. Alda-1 an ALDH2 activator, protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats via inhibition of oxidative stress. *Free Radical Research*. (2018) 52(6), 629-638.

Zhang ZJ, Hao K, Shi R, Zhao G, Jiang GX, Song Y, Xu X, Ma J. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and glutathione S-transferase T1 (GSTT1) null polymorphisms, smoking, and their interaction in oral cancer: a HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. (2011) 173(8), 847-857.

Zhou J, Weiner H. Basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*. (2000) 39(39), 12019-12024.

Zhou J, Weiner H. The N-terminal portion of mature aldehyde dehydrogenase affects protein folding and assembly. *Protein Science*. (2001) 10(8), 1490-1497.