

# EFFECTO DEL CATION DIVALENTE COBRE SOBRE LA ESTABILIDAD ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA RENAL

**Salcido Quijada JR, Figueroa Soto CG, Valenzuela Soto EM**

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) pertenece al grupo de las (ALDH9), y su forma tetramérica activa es un homotetramero de 232 kDa y la masa molecular de sus subunidades es de 54 kDa. En los mamíferos esta enzima se encarga de mantener el equilibrio osmótico en las células del tejido renal, debido a que constantemente estas se encuentran expuestas a condiciones de estrés oxidativo, el cual puede ser provocado por altas concentraciones de sodio (Na).

El cobre es un elemento esencial para la salud del cuerpo humano en condiciones normales (130–230 mg/100 mL de suero sanguíneo), pero en concentraciones elevadas puede ser tóxico. Se han realizado estudios en los que se ha evaluado el efecto del cobre sobre la enzima BADH, encontrándose un efecto inhibitorio a concentraciones micromolares.

En esta investigación se estudió el efecto de catión divalente Cu sobre la estructura terciaria y en el estado de agregación de la enzima a alta y baja fuerza iónica, a pH 7 y pH 8. Mediante análisis de emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano en un espectrofluorómetro PTI840, se determinaron los cambios en la estructura terciaria. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 296 nm y un rango de emisión de 300 a 450 nm. Se colectó el espectro de emisión de la BADH en presencia de  $\text{CuCl}_2$  10  $\mu\text{M}$  a diferentes tiempos de incubación y a un tiempo total de 60 minutos. Los cambios en el estado de agregación de la proteína se analizaron mediante electroforesis nativa y cromatografía de exclusión molecular.

La emisión de fluorescencia máxima de la BADH a pH 7 y baja fuerza iónica fue de 22705 UA a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 335 nm. Al transcurrir el tiempo de incubación de la BADH con  $\text{Cu}^{2+}$ , la emisión de fluorescencia fue disminuyendo. Al mismo pH y fuerza iónica fisiológica la emisión de fluorescencia de la enzima al tiempo 0 fue de 17368 UA a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 335 nm. Este valor es menor comparado con el de la BADH a baja fuerza iónica, Durante el tiempo de incubación la emisión fue disminuyendo, sin embargo después de los primeros 30 min el máximo de emisión no cambió. El ensayo de incubación de la BADH con  $\text{Cu}^{2+}$  a pH 8 y baja fuerza iónica, la emisión de fluorescencia máxima fue de 19088 UA a una longitud de onda ( $\lambda$ ) 335 nm. Como se encontró para pH 7, a pH 8 la emisión de fluorescencia fue disminuyendo conforme el tiempo de incubación fue transcurriendo. Bajo condiciones de fuerza iónica fisiológica la emisión máxima de fluorescencia a pH 8 fue de 17070 UA a una longitud de onda ( $\lambda$ ) 335nm. Durante el tiempo de incubación la emisión de fluorescencia cambio a los 5 min, a partir de este tiempo la emisión no cambió de manera importante.

Se calculo el centro espectral de masas (CEM) para determinar cambios en la estructura terciaria de la enzima, encontrándose que los CEM de la BADH a pH 7 con o sin fuerza iónica son de 346 nm a lo largo de los 60 min, por lo tanto el centro espectral de masas no cambió. El CEM calculado a pH 8 también fue de 346 nm, no hubo cambios desde el minuto 0 hasta el 60. Esto significa que la pérdida de actividad de la BADH en presencia de cobre no se debe a cambios en su estructura terciaria.

El análisis electroforetico de la enzima incubada durante 60 minutos en presencia de Cu 10  $\mu\text{M}$ ,

mostró que la presencia de Cu no tuvo efecto sobre la agregación de la BADH, este dato concuerda con estudios previos llevados a cabo con la BADH en presencia de  $Mn^{2+}$ .

Los datos muestran que el efecto inhibitorio del cobre sobre la BADH no se debe a cambios estructurales. Por lo que proponemos que dicho efecto puede deberse a cambios en el estado de oxido-reducción de las cisteínas, principalmente de la cisteína del sitio activo.