

EL SINGULAR CASO DE ALDA-1. UN MODULADOR DE LA ACTIVIDAD DE ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

Javier Alejandro Belmont-Díaz y José Salud Rodríguez-Zavala*

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

Resumen

La activación de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) tiene un gran potencial terapéutico para múltiples enfermedades humanas. El activador de ALDHs mejor caracterizado es un compuesto sintético denominado Alda-1. En el presente trabajo se muestra el efecto de Alda-1 sobre la cinética de la ALDH2 humana (isoforma mitocondrial), se analiza el tratamiento matemático para obtener los parámetros cinéticos y se discute el significado biológico del efecto de este singular activador.

Abstract

Activation of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) has great therapeutic potential for multiple human diseases. The best characterized ALDHs activator is a synthetic compound called Alda-1. The present work shows the effect of Alda-1 on the kinetics of human ALDH2 (mitochondrial isoform), analyzes the mathematical treatment applied to the data to obtain the kinetic parameters, and discusses the biological significance of the effect of this unique activator.

Introducción

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son una súper familia de enzimas que se encargan de oxidar aldehídos a sus correspondientes ácidos (1). Los aldehídos son compuestos orgánicos reactivos que se pueden formar por diversos procesos como en el metabolismo del etanol (2), la exposición a xenobióticos o como producto de la peroxidación de lípidos en condiciones de estrés oxidante (3). Estos aldehídos, pueden modificar la estructura de biomoléculas como el DNA (ácido desoxirribonucleico) (4) o proteínas (5), por lo que pueden ser muy nocivos para la célula, es por esta razón que la actividad de las ALDHs se considera de vital importancia para mantener la integridad celular (6).

Estudios en diversos modelos han mostrado que la activación de las ALDHs es capaz de proteger a la célula de diversos tipos de estrés (6-8), aunque se ha dado más énfasis al estudio del efecto sobre la activación de la isoforma mitocondrial (ALDH2). El activador de ALDH2 mejor caracterizado hasta la fecha es Alda-1, el

cual es un compuesto sintético con propiedades cardioprotectoras (9), neuroprotectoras (10) y hepatoprotectoras (11).

Cinética de los activadores no esenciales

Un activador no esencial se define como "una molécula capaz de incrementar la velocidad de una reacción catalizada por una enzima". El esquema general para describir la activación no esencial se presenta en la figura 1, donde α y β son factores adimensionales que representan la magnitud en la cual el activador modifica la afinidad de la enzima por el sustrato (K_s) y la velocidad máxima (V_m), respectivamente.

La ecuación de velocidad que rige la activación no esencial se presenta a continuación:

$$v = \frac{V_m[S] \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)}{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right) + [S] \left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right)} \dots \dots (1) [13]$$

*Autor de correspondencia: José Salud Rodríguez Zavala. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. Juan Badiano No.1, Col. Secc. XVI, Del. Tlalpan 14080, Ciudad de México. Correo E: jose.zavala@cardiologia.org.mx

En su forma de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) tenemos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \dots \dots (2)$$

La posición en el plano cartesiano de la intersección de las líneas resultantes del gráfico de dobles recíprocos, depende de la relación entre los factores α y β . Las ecuaciones 3 y 4, representan el valor en el punto de intersección en el eje de las ordenadas "Y" ($1/v$) y en el eje de las abscisas "X" ($1/[S]$), respectivamente.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \frac{(1 - \alpha)}{(\beta - \alpha)} \dots \dots (3)$$

$$\frac{1}{[S]} = \frac{1}{K_s} \frac{(1 - \beta)}{(\beta - \alpha)} \dots \dots (4)$$

En un caso ideal, el activador aumentaría la afinidad por el sustrato ($\alpha < 1$) y también la velocidad de catálisis ($\beta > 1$), por lo que la intersección ocurriría en el segundo cuadrante ($Y > 0$; $X < 0$). Existen activadores que sólo modifican la V_m ($\beta > 1$) sin modificar la afinidad ($\alpha = 1$) (activadores tipo V), cuya intersección del gráfico de dobles recíprocos ocurre sobre el eje negativo de "X" ($Y = 0$; $X < 0$). También se pueden encontrar moléculas que no modifican la V_m ($\beta = 1$), pero si incrementan la afinidad de la enzima por su sustrato ($\alpha < 1$) (activadores tipo K), por lo que el patrón de líneas intersectantes ocurre sobre el eje "Y" ($Y > 0$; $X = 0$). Es importante hacer

notar que la ecuación 1 también describe el comportamiento de inhibidores parciales ($\beta < 1$) o de un inhibidor competitivo parcial simple ($\beta = 1$; $\alpha > 1$; panel j), y tanto el patrón de inhibición como el de activación dependen de los valores de α y β (Fig. 2). Los casos presentados en los paneles k) y l) de la figura 2, corresponden a moléculas que poseen un comportamiento dual (notar la intersección en el primer cuadrante), es decir, en algunas concentraciones de sustrato la molécula se comporta como inhibidor y en otras concentraciones tiene propiedades de activador, por lo que en este trabajo nos referimos a estas moléculas simplemente como moduladores. Los casos reportados en la literatura de este tipo de moduladores son extremadamente raros.

2. Problema

En la tabla 1 se presentan los datos de actividad de la ALDH2 humana al variar la concentración de un aldehído (propanal), a una concentración saturante de NAD^+ , en presencia de diferentes concentraciones de Alda-1 (12). Con estos datos, calcular los parámetros cinéticos V_m , K_s , K_a , α , β y analizar cómo cambia la eficiencia catalítica con respecto a la concentración de Alda-1.

3. Solución

Al graficar los datos del problema se obtiene una familia de hipérbolas con velocidad cada vez mayor al incrementar la concentración de activador, como era de esperarse; sin embargo, las hipérbolas muestran un cruce a una concentración aproximada de $5 \mu M$ propanal (Fig. 3A). Al obtener el gráfico de dobles recíprocos, se toma la línea recta en

Tabla 1

Actividad de ALDH2 humana recombinante al variar la concentración de propanal y del activador Alda-1. La concentración de NAD^+ se mantuvo constante a 1 mM.

[Propanal] (μM)	v (nmol/min/mg)			
	Alda-1 (μM) 0	2	5	20
0	0	0	0	0
1	318	227	164	136
2	388	325	294	234
5	427	444	432	427
10	451	497	521	528
20	462	514	580	629
50	500	559	654	724

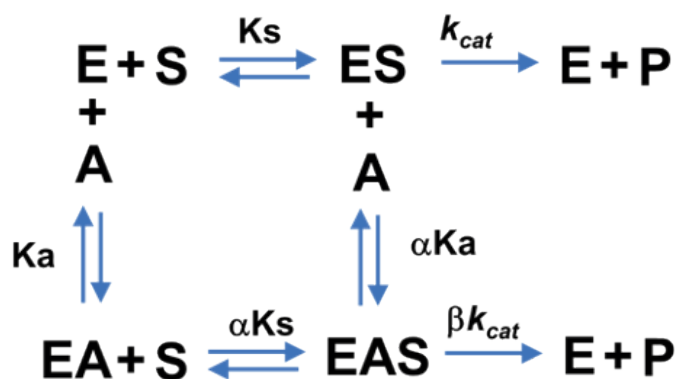


Figura 1. Esquema cinético que representa los posibles equilibrios de un activador no esencial (A), en una reacción catalizada por la enzima (E), donde el sustrato (S) es transformado a un producto (P). K_s representa la constante de disociación del complejo ES, k_{cat} es la constante de velocidad de catálisis, α es un factor adimensional que modifica a la K_s y β es un factor adimensional que afecta la velocidad de catálisis.

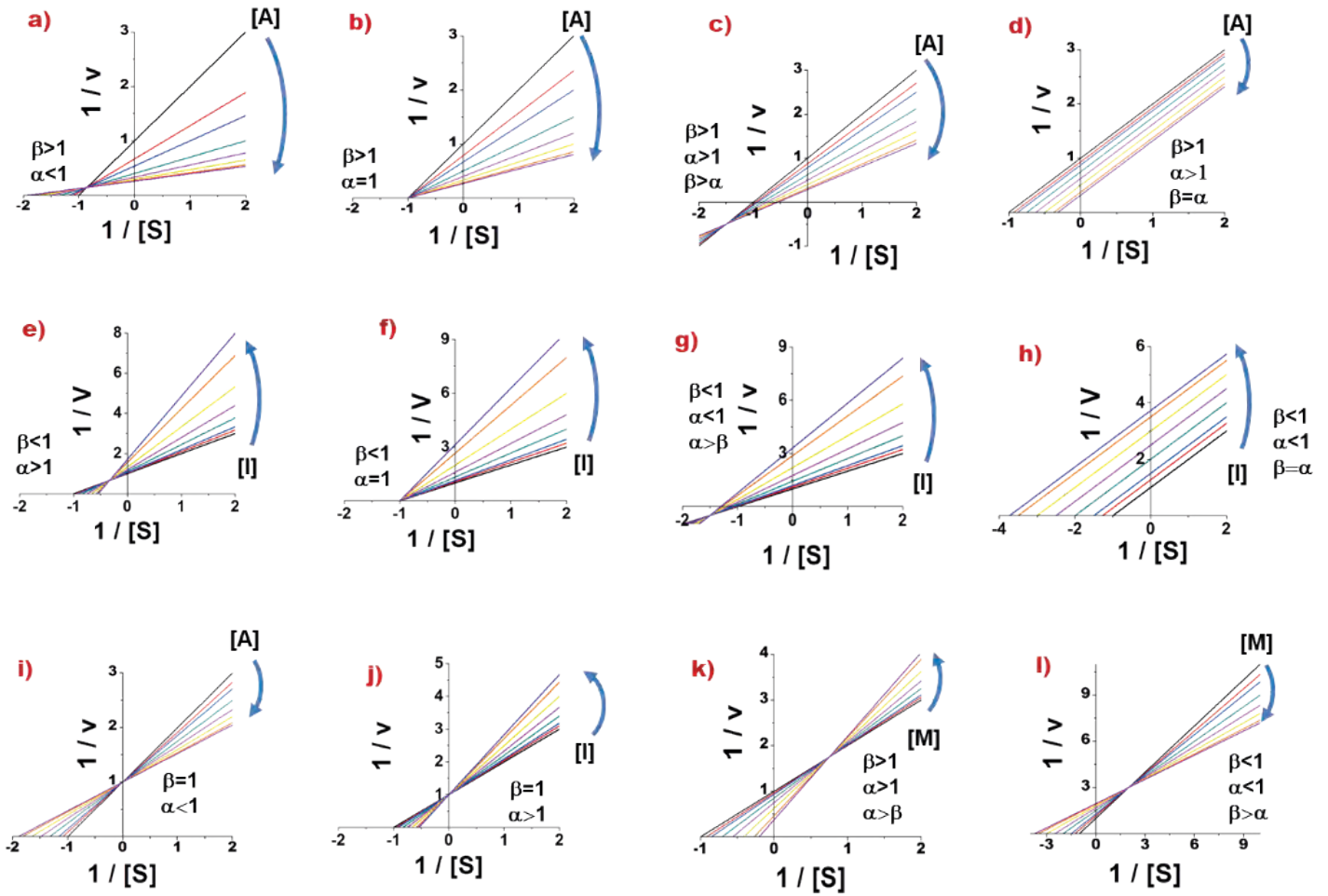


Figura 2. Patrones gráficos obtenidos a partir de la ecuación para un activador no esencial, donde **[A]** es la concentración de activador, **[I]** es la concentración de inhibidor y **[M]** es la concentración de modulador (una molécula con propiedades de inhibidor/activador). Las simulaciones se realizaron utilizando el software Microcal Origin ver 8.0. Las condiciones modeladas fueron: $K_s = 1$; $K_a = 1$; $V_m = 1$; **[A]**, **[I]** ó **[M]** = variable (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10), los valores de α y β varían en cada caso.

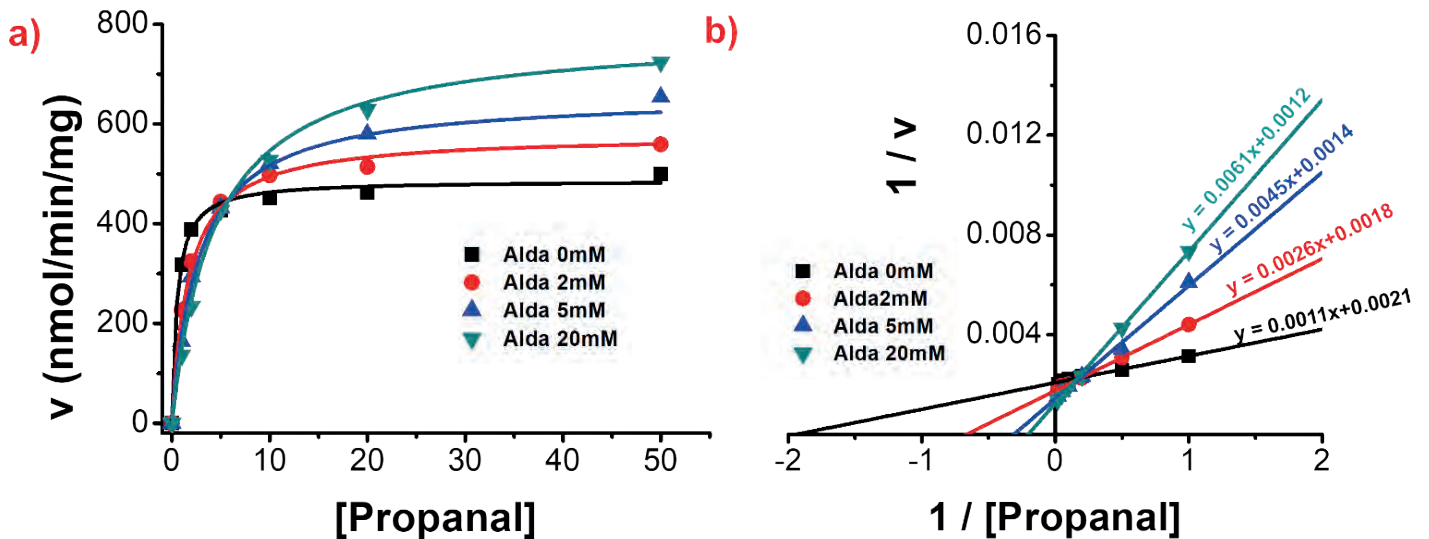


Figura 3. Gráfico directo (a) y de dobles recíprocos (b) de los datos de la actividad de ALDH2 en presencia de varias concentraciones de Alda-1. Los datos fueron obtenidos a partir de la tabla 1.

ausencia de activador y de ella se pueden calcular el valor de V_m a partir de la ordenada al origen y el valor de K_s a partir de la abscisa al origen (Fig. 3b). A partir de los términos que corresponden a la pendiente y a la ordenada al origen en la ecuación 1, se pueden crear regráficos que serán útiles para calcular los valores de α , β y K_a .

Análisis de la pendiente

La pendiente de la ecuación en su forma de dobles recíprocos (Ec. 2) se puede arreglar de la siguiente manera:

$$m = \frac{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \rightarrow$$

$$m = \frac{\alpha K_a K_s + \alpha K_s [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (5)$$

Cuando $[A]=0$ la ecuación (5) se expresa como:

$$m_0 = \frac{K_s}{V_m} \dots \dots (6)$$

Definiendo $\Delta m = m - m_0$ entonces tenemos:

$$\Delta m = m - m_0 = \frac{\alpha K_a K_s + \alpha K_s [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} - \frac{K_s}{V_m} \rightarrow$$

$$\Delta m = \frac{K_s [A] (\alpha - \beta)}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (7)$$

Al obtener el doble recíproco de la ecuación 7, se obtiene una línea recta que es de utilidad para obtener los parámetros que restan por calcular (Ec. 8).

$$\frac{1}{\Delta m} = \frac{\alpha K_a V_m}{K_s (\alpha - \beta)} \frac{1}{[A]} + \frac{\beta V_m}{K_s (\alpha - \beta)} \dots \dots (8)$$

Análisis de las ordenadas al origen

Al igual que el análisis de las pendientes, el de las ordenadas al origen nos permitirá obtener una expresión de utilidad para calcular K_a , α y β . La ordenada al origen de la Ec. 2 puede arreglarse de la siguiente manera:

$$b = \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \rightarrow b = \frac{\alpha K_a + [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (7)$$

Cuando $[A]=0$ la ecuación (7) se expresa como:

$$v_0 = \frac{1}{V_m} \dots \dots (8)$$

Definiendo $\Delta b = b - b_0$ entonces tenemos:

$$\Delta b = b - b_0 = \frac{\alpha K_a + [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} - \frac{1}{V_m} \rightarrow$$

$$\Delta b = \frac{[A] (1 - \beta)}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (9)$$

Al obtener el doble recíproco de la ecuación 9, se obtiene una línea recta que también es de utilidad para obtener los parámetros que restan por calcular (Ec. 10)

$$\frac{1}{\Delta b} = \frac{\alpha K_a V_m}{(1 - \beta) [A]} + \frac{\beta V_m}{(1 - \beta)} \dots \dots (10)$$

Determinación de los parámetros cinéticos

- K_s y V_m

Cuando el término $[A]=0$, entonces la expresión de dobles recíprocos queda expresada de la siguiente manera:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \dots \dots (11)$$

Por lo tanto, la ordenada al origen de la recta sin activador es igual a $1/V_m$ y la abscisa al origen de la recta es $-1/K_s$, de tal forma que obtenemos los valores de la Tabla 2.

- K_a , α y β

Al obtener $1/\Delta m$ y $1/\Delta b$ a partir de las rectas de la figura 3, se obtienen los datos de la tabla 3. La grafica de $1/[Alda-1]$ vs $1/\Delta m$ ó $1/\Delta b$ da como resultado el regráfico mostrado en la figura 4. Utilizando las ecuaciones de los regráficos presentes en la figura 4, es posible obtener los parámetros faltantes (Tabla 4).

Conclusiones

El análisis de la ecuación para activadores no esenciales revela la posibilidad de la existencia de moléculas que disminuyan la afinidad de la enzima por el sustrato ($\alpha > 1$) al mismo tiempo que incrementan su velocidad máxima ($\beta > 1$), si se dan estas condiciones y además $\alpha > \beta$, entonces se obtiene una

Tabla 2

Parámetros cinéticos determinados a partir del análisis de dobles recíprocos de los datos de la tabla 1 en ausencia de activador.

Parámetro	Valor
$1/V_m$	0.0021
V_m (nmol/min/mg)	476
$-1/K_s$	-1.91
K_s (μM)	0.52

Tabla 4

Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de los datos de la figura 2.

Parámetro cinético	Valor
K_a (μM)	1.03
α	29.34
β	3.4

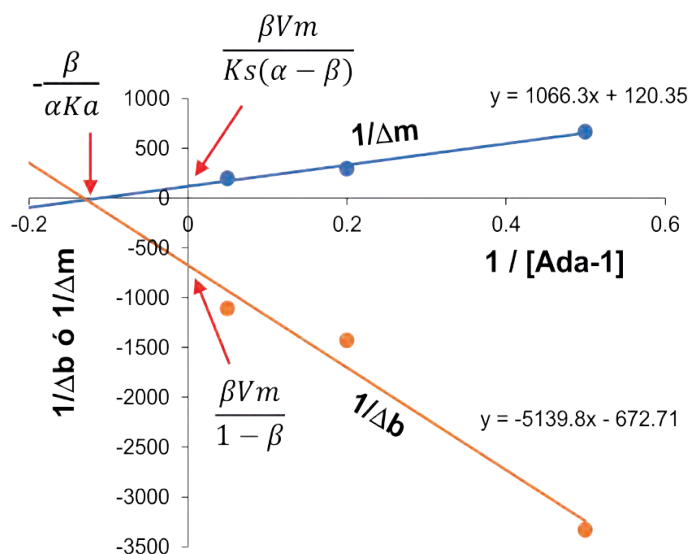


Figura 4. Re gráfico obtenido del análisis de las pendientes y de las ordenadas al origen de la ecuación de activación en su forma de dobles recíprocos. Este gráfico es útil para el cálculo de K_a , α y β . El valor de β se puede estimar a partir de la ordenada al origen del regráfico de $1/\Delta b$ vs $1/\text{Alda}$ y utilizando el valor de V_m previamente calculado. A partir de la ordenada al origen del regráfico de $1/\Delta b$ vs $1/\text{Alda}$ y puesto que se conoce el valor de la V_m , se obtiene el valor de β . Este valor se puede usar en la ordenada al origen de $1/\Delta m$ vs $1/\text{Alda}$ para obtener α , y los valores de α y β se usan en la abscisa de cualquiera de los regráficos ($1/\Delta b$ vs $1/\text{Alda}$ ó $1/\Delta m$ vs $1/\text{Alda}$) para obtener la K_a .

Tabla 3

Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de los datos de la figura 2.

[Alda-1] (μM)	m	b	Δm (m-m ₀)	Δb (b-b ₀)	1/Alda	1/Δm	1/Δb
0	0.0011	0.0021	0	0			
2	0.0026	0.0018	0.0015	-0.0003	0.5	667	-3333
5	0.0045	0.0014	0.0034	-0.0007	0.2	294	-1429
20	0.0061	0.0012	0.005	-0.0009	0.05	200	-1111

zona de inhibición y una zona de activación dependiendo de la concentración de sustrato. El caso de Alda-1 es uno de los pocos documentados donde se puede estudiar este fenómeno dual de inhibición / activación, el cual puede ser un factor muy importante para considerar en un contexto terapéutico.

Se ha propuesto que el mecanismo de protección celular por la activación de las ALDHs se debe a un incremento en la capacidad de desintoxicación de aldehídos reactivos. Dado que Alda-1 muestra una cinética dual de inhibición (en concentraciones bajas de aldehído) y activación (en concentraciones altas de aldehído) en el caso de ALDH2, entonces, es razonable pensar que el efecto protector de Alda-1 al activar a esta enzima será posible solo en condiciones donde la exposición a aldehídos reactivos sea elevada ($>5\mu\text{M}$), mientras que en condiciones de bajos niveles de aldehído ($<5\mu\text{M}$), no habrá protección por ALDH2, e incluso se podrían promover efectos nocivos.

5. Referencias

- Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD & Vasiliou V (2012) Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol. Rev.* 64, 520–539.

2. Lieber CS (2004) Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34, 9–19.
3. Fritz KS & Petersen DR (2013) An Overview of the Chemistry and Biology of Reactive Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 59, 85–91.
4. Voulgaridou GP, Anastopoulos I, Franco R, Panayiotidis MI & Pappa A (2011) DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 13–27.
5. Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S & Uchida K (2001) Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: Implications for oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276, 23903–23913.
6. Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER & Mochly-Rosen D (2014) Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.* 94, 1–34.
7. Calleja LF, Yoval-Sánchez B, Hernández-Esquível L, Gallardo-Pérez JC, Sosa-Garrocho M, Marín-Hernández Á, Jasso-Chávez R, Macías-Silva M & Rodríguez-Zavala J (2021) Activation of ALDH1A1 by omeprazole reduces cell oxidative stress damage. *FEBS J.* 288, 4064–4080.
8. Yoval-Sánchez B, Calleja LF, de la Luz Hernández-Esquível M & Rodríguez-Zavala JS (2020) Piperlonguminine a new mitochondrial aldehyde dehydrogenase activator protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1864, 129684.
9. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD & Mochly-Rosen D (2008) Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* (80-.). 321, 1493–1495.
10. Khan M, Qiao F, Kumar P, Islam SMT, Singh AK, Won J & Singh I (2022) Neuroprotective effects of Alda-1 mitigate spinal cord injury in mice: Involvement of Alda-1-induced ALDH2 activation-mediated suppression of reactive aldehyde mechanisms. *Neural Regen. Res.* 17, 185–193.
11. Li M, Xu M, Li J, Chen L, Xu D, Tong Y, Zhang J, Wu H, Kong X & Xia Q (2018) Alda-1 ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by activating aldehyde dehydrogenase 2 and enhancing autophagy in mice. *J. Immunol. Res.* 2018, 9807139.
12. Belmont-Díaz JA, Yoval-Sánchez B, Calleja-Castañeda LF, Pardo Vázquez JP & Rodríguez-Zavala JS (2016) Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS J.* 283, 3637–3650.
13. Segel IH. (1993) Enzyme Activation. in *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* (Segel IH, ed), pp. 227–231. John Wiley & Sons Inc., New York, NY.).