

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS**

**Cuantificación proteica de betaína aldehído deshidrogenasa durante  
hipertrofia cardiaca fisiológica en rata**



**TESIS PROFESIONAL  
PRÁCTICA**

Que para obtener el Título de

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

**Juan Alberto Espinoza  
Salazar**

Navojoa, Sonora

Mayo de 2018

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**

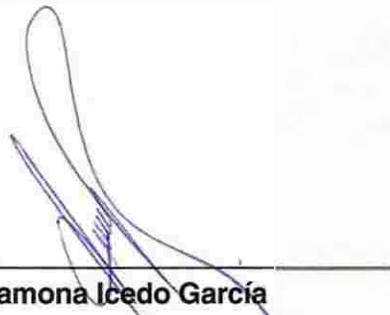


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se le dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Jefe de Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la universidad de Sonora Unidad Regional Sur (DCQBA-USON,URS).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis deberá dar crédito al DCQBA-USON, URS., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



---

**M.C. Ramona Icedo García**

Jefe del Depto. de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

## APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar la Tesis Profesional Práctica de Juan Alberto Espinoza Salazar, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



---

**Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez**  
Presidente



---

**Dr. José Guadalupe Soñanez Organis**  
Secretario



---

**M.C. Norma Aurora Stephens Camacho**  
Vocal



---

**M.C. Sarai Limón Miranda**  
Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darme salud y vida.*

*A mi alma mater Universidad de Sonora.*

*A mi comité de Tesis por sus atentos comentarios y ayuda.*

*A mi asesor Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez por siempre asesorarme, guiarme de la manera correcta y brindarme su amistad.*

## **DEDICATORIA**

A mis padres Octavio Alberto Espinoza Tamayo y Yolanda Salazar Galaviz por su inmenso e incondicional apoyo durante todas las etapas de mi vida.

A mis hermanas Erika Espinoza Salazar y Yuvitza Concepción Espinoza Salazar por su apoyo incondicional. Demostración que nunca hay que rendirse en las metas que nos proponemos.

A Mirna Karina Brena Solís y Gael Alberto Espinoza Brena por formar parte de mis propósitos y metas.

A mis compañeros de laboratorio José Arquímides, Cesar Jeravy López, Rafael Clark, José Francisco Chipres, Mónica Matuz, Melissa Miranda, José Alberto Alcantar y Jennifer Llamas, por siempre brindarme su apoyo y amistad.

A mis amigos Cristina Isel Rocha Esquer, Daniel Alberto Lima, Samanta Rosas, Perla Pacheco, Osear Gutiérrez, Rafael Clark, Mario Laveaga, Karina Adame, Jose Arquimides, por siempre brindarme su apoyo, amistad y los mejores consejos.

A mis maestros los cuales han formado parte de mi formación académica, en especial al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez y Dr. José Guadalupe Soñanez Organis por brindarme su amistad y el apoyo para lograr este proyecto de investigación tan significativo en mi carrera.

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| DECLARACIÓN INSTITUCIONAL .....   | 1  |
| AGRADECIMIENTOS.....  | 3  |
| DEDICATORIA .....   | 4  |
| CONTENIDO.....  | 5  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | 7  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 8  |
| ANTECEDENTES .....  | 10 |
| El Corazón.....   | 10 |
| Estructura y función .....  | 10 |
| Hipertrofia cardiaca .....  | 10 |
| El corazón durante la preñez.....   | 12 |
| Osmolitos orgánicos como mecanismos de adaptación durante la hipertrofia cardiaca fisiológica ..... | 12 |
| Glicina betaína .....   | 13 |
| Betaína aldehído deshidrogenasa .....   | 15 |
| JUSTIFICACIÓN .....   | 18 |
| HIPÓTESIS .....   | 19 |
| OBJETIVOS .....   | 19 |
| Objetivos Específicos .....   | 19 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 20 |
| Manejo de animales y colección de muestras .....  | 20 |
| Extracción y cuantificación de proteínas citoplasmáticas.....                                       | 20 |
| Detección del nivel de proteína de BADH (ALDH9A1) mediante Western Blot.....                        | 21 |
| Cuantificación de la concentración de BADH mediante la tecnología libre de tinción.....             | 22 |
| Análisis Estadístico .....  | 22 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 23

    Cuantificación de BADH (ALDH9a1) en ventrículo izquierdo de rata durante la hipertrofia  
    cardíaca fisiológica. .... 23

CONCLUSIÓN ..... 29

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| 1.            | Betaína y sus derivados.  | 13            |
| 2.            | Biosíntesis de glicina betaína.   | 14            |
| 3.            | Árbol filogenético de ALDH's.   | 15            |
| 4.            | Reacción de oxidación de betaína aldehído a glicina betaína catalizada por BADH.  | 16            |
| 5.            | Análisis de concentración de proteínas en geles TGX-Stain-Free.   | 23            |
| 6.            | Inmunodetección de BADH con anticuerpo Anti-ALDH9a1 en membranas de PVDF.   | 24            |
| 7.            | Control de carga SDS-PAGE (verde) e inmunodetección de BADH en membrana de PVDF (Rojo), con variante de concentración proteínica.         | 26            |
| 8.            | Análisis de la correlación de carga total de proteína en SDS-PAGE y volumen (intensidad) en gel libre de tinción.                         | 26            |
| 9.            | Análisis de la correlación de carga total de proteína en SDS-PAGE y volumen (intensidad) del anticuerpo ALDH9A1.                          | 27            |
| 10.           | Análisis de normalización de datos en la cuantificación de BADH mediante la tecnología libre de tinción en las muestras C, P12, P18 Y PP. | 29            |

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardíacas representan el 31% de las causas de muerte a nivel mundial. La hipertrofia cardíaca es considerada un factor de riesgo determinante en lo que morbilidad y mortalidad respecta por enfermedades cardíacas (Assayag y col., 1997; Narula y col., 1998). La hipertrofia cardíaca se clasifica en patológica (proceso irreversible), y fisiológica (proceso reversible) distinguida por la ganancia de peso en el músculo cardíaco debido a la sobrecarga hemodinámica ante un desafío fisiológico (como embarazo o ejercicio extenuante). La hipertrofia se presenta como una respuesta adaptativa para normalizar el estrés mecánico sobre la pared del ventrículo izquierdo y optimizar la función del corazón (Carreño y col., 2006; Herron y col., 2010; Mehrotra y col., 2013; Merkle y col., 2007; Wilkins y Molkentin, 2002). Se ha descrito que durante el embarazo, el corazón pasa por un evento hipertrófico fisiológico reversible en respuesta al estrés mecánico sobre las paredes miocárdicas, compuestas primordialmente por células musculares de contracción nombradas miocitos o cardiomiocitos (Grossman y col., 1975; Nagatomo y col., 1999). Durante la hipertrofia cardíaca los miocitos sufren un hinchamiento debido al desafío hipo-osmótico, que aunado a la baja permeabilidad que poseen los miocitos, compromete la adaptación estructural por el cambio osmótico y la regulación del volumen celular (Wright y Rees, 1998). Para contrarrestar los efectos adversos del estrés en miocitos, existe la acumulación de moléculas orgánicas de bajo peso molecular denominadas osmolitos orgánicos, que ayudan a la regulación del volumen celular. Los osmolitos son clasificados en azúcares, polioles, metilaminas, aminoácidos y derivados, y se pueden acumular en altas concentraciones sin causar perturbación a nivel celular, aportando grandes beneficios por sus características de ser solutos compatibles (Yancey, 2005).

Glicina betaína (GB) es una amina cuaternaria, osmolito y donador de grupos metilo proveniente de la oxidación de colina (Lever y Slow, 2010). Los mamíferos utilizan GB para ayudar a la regulación del volumen celular (osmoprotector y osmoregulador), y es una fuente importante de grupos metilo que favorece la remetilación de homocisteína a metionina reduciendo los riesgos cardiovasculares (Feng y col., 2001; Lang., 2007; Schliess y Häussinger, 2002). El paso final de la síntesis de GB se lleva a cabo a través de una reacción de oxidación, catalizada por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), que además

es esencial en el catabolismo de poliaminas, la síntesis del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la biosíntesis de carnitina (Boyd y col., 1991; Cánovas y col., 1998; Ciales y García, 2004; Lamark y col., 1991).

La BADH (EC 1.2.1.8) es una de las enzimas más ancestrales de respuesta estrés, la cual pertenece a la superfamilia de aldehído deshidrogenasas (ALDH9), implicada en la detoxificación de aldehídos. Conforman un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de betaína aldehído (BA) a GB, dependiente de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido NAD<sup>+</sup> (Hempel y col., 1993). La BADH se purificó por primera vez en hígado de ratas Sprague-Dawley, obteniendo fracciones citosólicas y mitocondriales, se demostró que BADH en rata se encuentra mayoritariamente en citoplasma y solo el 7% de la actividad total se localiza en mitocondria (Pietruszko y Chern, 2001; Vaz y col., 2000; Wilken y col., 1970).

La BADH se purificó y se caracterizó de la mucosa intestinal de rata, lo que demostró que esta enzima comparte ciertas propiedades con la isoenzima E3, argumento que apoya que la ALDH9 proviene del mismo gen en mamíferos. La distribución y actividad de BADH en distintos tejidos de mamíferos demostró, que la BADH en el músculo cardíaco posee baja actividad enzimática en comparación con otros órganos (hígado y músculo esquelético) (Gonzalo Izaguirre y col., 1997). Las bajas concentraciones de BADH en corazón sano, es la posible causa de la falta de investigaciones de BADH en el tejido cardíaco. Es importante destacar que BADH es una enzima de respuesta a estrés, la cual puede elevarse bajo condiciones de estrés como en la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el embarazo en ratas Sprague-Dawley.

## **ANTECEDENTES**

### **El Corazón**

#### **Estructura y función**

El corazón es un órgano encargado de bombear la sangre a todo el organismo, transportando oxígeno y nutrientes a las células. La parte interna está constituida por cuatro cavidades: aurícula derecha, aurícula izquierda (encargadas de recibir la sangre), ventrículo derecho y ventrículo izquierdo (encargados de bombear sangre). La pared cardíaca está constituida por: pericardio, miocardio y endocardio. El pericardio es un espacio gelatinoso que encierra a todo el corazón brindándole protección y tiene la característica de evitar la fricción. El miocardio, es el tejido más grueso compuesto por capilares sanguíneos, linfoides y tejido nervioso, y el endocardio está constituido por epitelio y tejido conectivo (Sunthareswaran, 1999).

Las aurículas se encuentran divididas por un tabique muscular interauricular y los ventrículos son separados por el tabique interventricular. La pared ventricular izquierda es gruesa debido a que se encarga de bombear la sangre oxigenada a todo el cuerpo, mientras que la pared ventricular derecha es más delgada, pues bombea la sangre desoxigenada a pulmón, donde hay una menor resistencia en el flujo (Macaya, 2007).

El ventrículo izquierdo es más largo y estrecho que el derecho, cuenta con capacidad para relajarse rápidamente (lo que le permite formar parte de la relajación diastólica y de llenado), contraerse rápidamente (participando en la contracción sistólica y eyección) y aumentar o disminuir la capacidad de bombeo cuando hay cambios en la presión o volumen sanguíneo (Macaya, 2007). La hipertrofia afecta principalmente al ventrículo izquierdo, y es una de las anomalías más frecuentes causadas por la hipertensión arterial y un alto riesgo como factor cardiovascular (Villamil y Zilberman, 2000).

#### **Hipertrofia cardíaca**

La hipertrofia cardíaca (HC) es un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad en personas con enfermedades cardiovasculares (ECV). Siendo ECV la principal causa de muerte a nivel

mundial (OMS 2017). La HC se caracteriza por el engrosamiento de la pared ventricular y reducción del funcionamiento mecánico (Assayag y col., 1997; Chung y Leinwand, 2014; Narula y col., 1998).

La HC se caracteriza por el aumento en el tamaño de los miocitos (Kaur y col., 2013; Lee y col., 2012; Merkle y col., 2007), en respuesta a la sobrecarga hemodinámica causada por un daño o desafío fisiológico (como embarazo o ejercicio extenuante). HC es una respuesta adaptativa que normaliza el estrés biomecánico sobre la pared ventricular y optimiza la función del corazón (Carreño y col., 2006; Herron y col., 2010; Mehrotra y col., 2013; Merkle y col., 2007; Wilkins y Molkentin, 2002).

La hipertrofia puede clasificarse en fisiológica o patológica, a su vez pueden ser concéntricas o excéntricas, una es ocasionada por la sobrecarga de presión y la otra por sobrecarga de volumen (Chung y Leinwand, 2014). Cuando se presenta un estímulo patológico, la sobrecarga de presión produce un aumento en la presión sistólica resultando en hipertrofia concéntrica, la cual está caracterizada por engrosamiento de las paredes miocárdicas por la acumulación de colágena. Esta hipertrofia se clasifica como patológica y es la respuesta del miocardio a cualquier enfermedad como la hipertensión arterial, infartos de miocardio y mutaciones genéticas (Lang y col., 2006).

En la hipertrofia fisiológica existe sobrecarga de volumen, produciendo aumento en la tensión de la pared diastólica, resultando en hipertrofia excéntrica. Este tipo de hipertrofia se presente en alteraciones como insuficiencias valvulares y en respuestas fisiológicas adaptativas que son reversibles en ejercicio extenuante y embarazo. Durante la etapa del embarazo el corazón presenta adaptaciones fisiológicas desde las primeras semanas, los más significativos son cambios cardiovasculares, entre los cuales se destaca el aumento de flujo sanguíneo en algunos órganos cubriendo mayores necesidades metabólicas. El gasto cardíaco de una mujer durante el embarazo se incrementa 1.5 veces en comparación con la mujer no gestante (Christianson, 1976; Purizaca, 2010), observándose cambios significativos en los primeros dos trimestres y alcanzando sus niveles más altos en la semana 16 de gestación. A las 20 semanas de gestación este valor deja de aumentar, pero se mantiene en sus valores más altos hasta el parto (Hunter y Robson, 1992).

## **El corazón durante la preñez**

En estado de preñez, el corazón sufre un crecimiento hipertrófico fisiológico reversible en respuesta al aumento del gasto cardíaco y el estrés biomecánico. Uno de los principales cambios en el embarazo es el desarrollo de hipertrofia cardíaca, este cambio está acompañado del aumento en: 1) el gasto cardíaco, 2) el volumen latido, 3) el volumen sanguíneo, 4) la frecuencia cardíaca, 5) el flujo sanguíneo renal y 6) la tasa de filtración a nivel glomerular (Purizaca, 2010). Al mismo tiempo se presenta una disminución en: 1) la resistencia vascular periférica, 2) la presión sanguínea media durante el segundo y tercer trimestre, 3) la disminución del tiempo de eyección del ventrículo izquierdo a lo largo de todo el periodo de gestación (Baylis y Reckelhoff, 1991; Capeless y Clapp, 1989; Chapman y col., 1997; Gilson y col., 1992; Katz y col., 1978; Mabie y Sibai, 1994; Slangen y col., 1997; Spaanderman y col., 2000; M. Spaanderman y col., 2000). En el caso de la preñez, una de las señales del inicio de la hipertrofia es la distensión arterial durante el llenado ventricular. La hipertrofia generada por sobrecarga de volumen generalmente es menor que la producida por sobrecarga de presión (Grossman y col., 1975; Nagatomo y col., 1999).

## **Osmolitos orgánicos como mecanismos de adaptación durante la hipertrofia cardíaca fisiológica**

La adaptación durante la hipertrofia cardíaca fisiológica se origina por elementos promotores de crecimiento en la pared ventricular, para normalizar el estrés al que se encuentra sometido el ventrículo frente a una carga hemodinámica. Durante los eventos de crecimiento, embarazo o actividad física extenuante, la sobrecarga hemodinámica produce aumento del tamaño en miocitos (H. E. Cingolani y col., 2008; O. H. Cingolani y col., 2011; Ennis y col., 2008).

En la hipertrofia cardíaca los miocitos se ven involucrados en un evento hipo-osmótico, es decir niveles intracelulares altos en agua y baja concentración de solutos. Considerando que las células cardíacas tienen baja permeabilidad en comparación con células sanguíneas y renales, los miocitos cardíacos se ven mayormente comprometidos a la adaptación del cambio osmótico (Wright y Rees, 1998).

La hipertrofia fisiológica en el embarazo se acompaña de complejos procesos que permiten a la madre adaptarse a sus nuevas necesidades (Yannone, 1972). Durante estas condiciones de estrés en cardiomiocitos se conoce que existen moléculas orgánicas las cuales ayudan en la regulación del volumen celular. Estas moléculas son llamadas osmolitos y se han descrito como pequeños solutos que utilizan las células de gran cantidad de organismos para regular el volumen celular. Estos solutos son aminoácidos y derivados (glicina, prolina, taurina, alanina, etc.), azúcares (trehalosa), polioles (glicerol, inositoles, sorbitol, etc.) y metilaminas (N-óxido de trimetilamina [TMAO] y GB) (Yancey, 2005).

### **Glicina betaína**

La GB comúnmente conocida como betaína es una amina cuaternaria (Fig.1) que fue descubierta por el científico alemán Scheibler en 1860 (Scheibler, 1869, 1870), una base orgánica proveniente de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y por ello su nombre de origen. Los grupos funcionales catiónicos de GB no pueden ser desprotonados y conservan su carga a pH elevado, es muy soluble en agua y casi insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos (De Zwart y col., 2003). Se conoce que GB posee importantes funciones en el metabolismo de los mamíferos (Lever y Slow, 2010).

GB es un osmolito esencial y donador de grupos metilo proveniente de la oxidación de colina (Lever y Slow, 2010). Comúnmente se encuentra en todos los organismos vivos y su metabolismo se lleva a cabo en el ciclo de remetilación de homocisteína a metionina en una reacción catalizada por la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT), su función como donador de grupos metilo es de gran participación en las reacciones de metilación de DNA y RNA (realizadas en hígado). Se acumula en gran variedad de tejidos ayudando a la regulación del volumen celular (Feng y col., 2001; Lang., 2007; Schliess y Häussinger, 2002). Además, actúa como una fuente de nitrógeno y protector en células de mamíferos, ayuda en la formación de fosfatidilcolina, un importante constituyente de la bicapa lipídica de las membranas celulares (Frontiera y col., 1994; Smolin y Benevenga, 1989; Stryer, 1995). GB también es un soluto compensatorio o contrarrestante, que mejora la estabilidad proteica

(Gilles, 1997) y es particularmente eficaz para contrarrestar el efecto desnaturalizante de la urea (Venkatesu y col., 2009; Yancey y Somero, 1979).

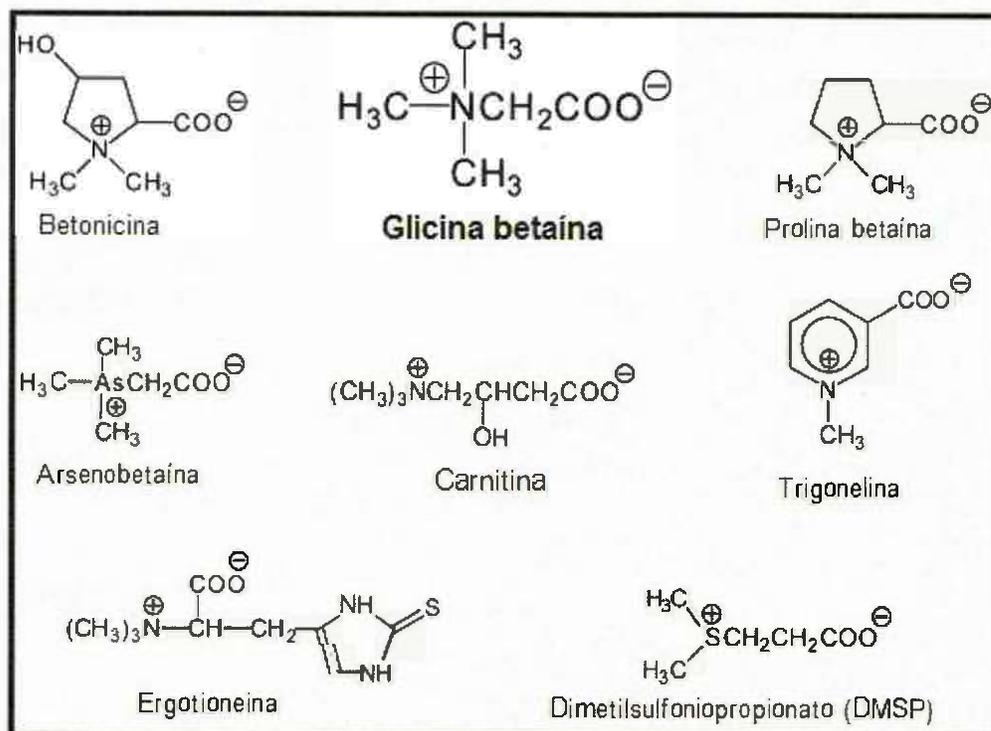


Figura 1. Betaína y sus derivados.

Fuente: (Lever y Slow, 2010).

La producción de GB se lleva a cabo en dos etapas de oxidación sobre colina, vía que ya se ha descrito tanto en eucariotas como en procariontas (McCue y Hanson, 1990). Existen dos diferentes rutas para la biosíntesis de GB, las enzimas involucradas en los diferentes procesos son: colina monooxigenasas (CMO) y betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) dependiente de NAD<sup>+</sup> (Brouquisse y col., 1989; Weigel y col., 1986). En células de mamíferos y microorganismo como *Escherichia coli* la síntesis es iniciada por la colina deshidrogenasa (CDH) enzima unida a la membrana dependiente de oxígeno, en combinación con BADH (Fig. 2) (Boyd y col., 1991; Cánovas y col., 1998; Lamark y col., 1991; Landfald y Strøm, 1986; Weigel y col., 1986; Wilken y col., 1970).

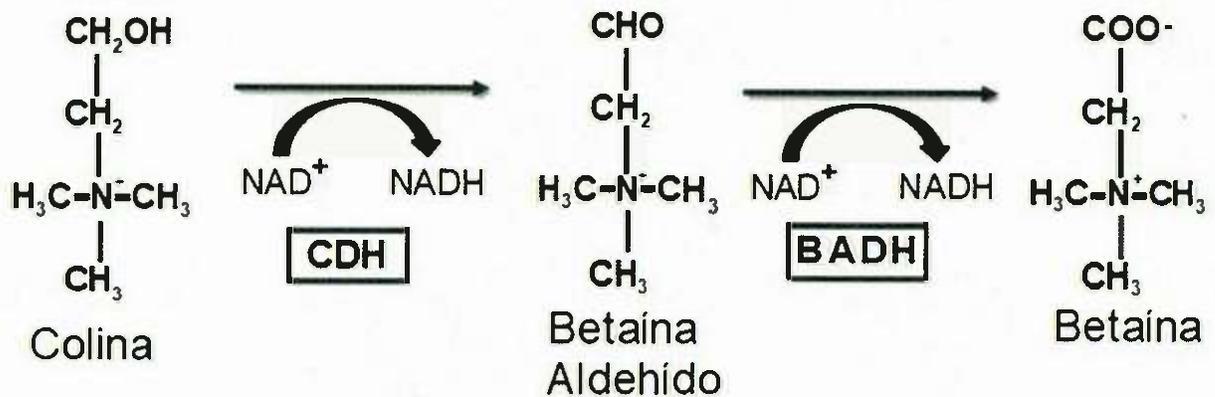


Figura 2. Biosíntesis de Glicina Betaina.

Fuente: (Sakamoto y Murata, 2000).

### Betaina aldehído deshidrogenasa

La BADH es una de las enzimas más ancestrales de respuesta a estrés, que pertenece a la superfamilia de aldehído deshidrogenasas (ALDHs), las cuales poseen una amplia distribución filogenética (Fig. 3). La BADH se encuentra ubicada en el grupo de las ALDH9 junto con las BADH de mamíferos, plantas y bacterias (Sánchez y col., 2007).

ALDH son enzimas importantes de las vías celulares que metabolizan distintos aldehídos y que se le han atribuido funciones importantes en la desintoxicación y defensa celular (Hempel y col., 1993); (Kurys y col., 1989). En humanos se observan clases estructurales distintas con distribuciones subcelulares específicas, enzimas unidas a  $\text{NAD}^+$  ó  $\text{NAD(P)}$  dependientes que actúan sobre una amplia variedad de sustratos aldehídos convirtiéndolos a ácidos carboxílicos. Se han descrito las estructuras primarias de una serie de ALDHs provenientes de bacterias, hongos y plantas (Ambroziak y col., 1991; George y col., 2007; Gonzalo Izaguirre y col., 1997; G Izaguirre y col., 1997; Sánchez y col., 2007; Sunkar y col., 2003)

Existen tres isoenzimas de ALDHs ligadas a  $\text{NAD}^+$ , que poseen alta especificidad de sustrato y valores bajos de  $K_m$  para aldehídos alifáticos de cadena corta que son producidas

en el organismo como isoenzimas E1 (ALDH1), E2 (ALDH2) y E3 (ALDH9). Estas isoenzimas se purificaron y caracterizaron en hígado humano (Greenfield y Pietruszko, 1977; Kikonyogo y Pietruszko, 1996; Kurys y col., 1989; Ryzlak y Pietruszko, 1988) y también se ha purificado y caracterizado parcialmente de hígado de rata (Ambroziak y Pietruszko, 1991; Goldberg y McCaman, 1968), donde también se han obtenido fracciones citosólicas y mitocondriales. Con la evidencia de que su actividad es 93% citosólica y que solo el 7% total de la actividad se localiza en mitocondria. Las isoenzimas E1 y E2 no presentan actividad frente al sustrato betaína aldehído, sin embargo la E3 utiliza como sustratos preferentes a  $\gamma$ -aminobutiraldehído y betaína aldehído (Chern y Pietruszko, 1995). Se ha determinado que la E3 cataliza las deshidrogenación de  $\gamma$ -trimetilaminobutiraldehído el cual resulta ser un intermediario en la biosíntesis de carnitina, por lo cual la BADH podría considerarse en otros mecanismos como en la biosíntesis y regulación de carnitina (Pietruszko y Chern, 2001)

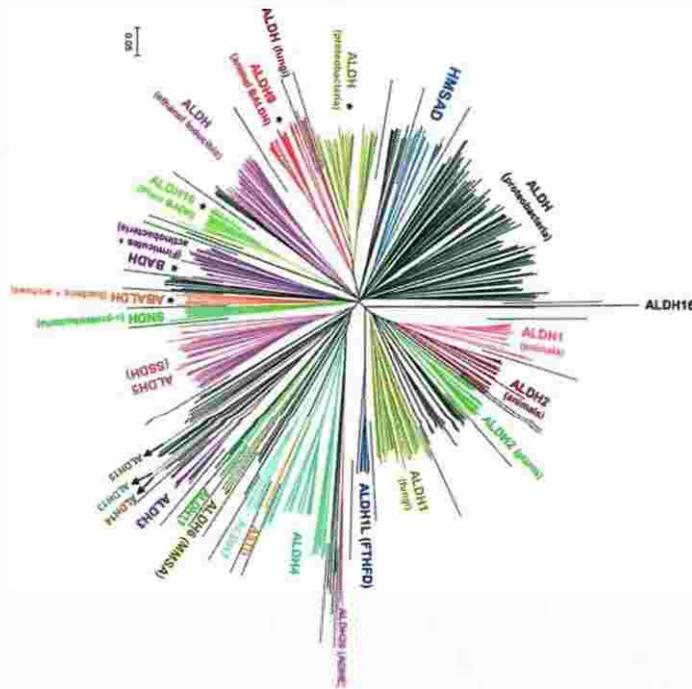


Figura 3. Árbol filogenético de ALDH's.  
Fuente: (Julián-Sánchez y col., 2007).

BADH conforma un grupo de enzimas que catalizan la oxidación irreversible de BA a GB (Fig. 4), convirtiendo aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos con la ayuda de la coenzima  $\text{NAD}^+$ , a partir de colina u otros de sus precursores (Ciares y García, 2004).

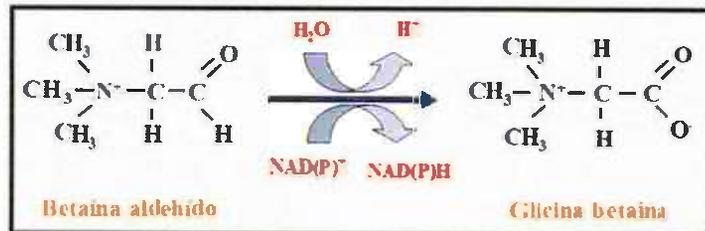


Figura 4. Reacción de oxidación de BA a GB catalizada por la BADH  
Fuente: (Muñoz-Ciares y Velasco-García, 2004).

Las BADH son específicas a sus sustratos aldehídos, pueden desempeñar distintas funciones fisiológicas; y en relación con su especificidad de coenzima. BADH se ha purificado a partir de una variedad de organismos, incluidas bacterias, animales y plantas. Están codificadas por el gen: ALDH9 en mamíferos, ALDH10 en bacterias y plantas (Ciares y García, 2004; Dragolovich y Pierce, 1994; Falkenberg y Strøm, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Ciares, 1994). Además de sintetizar GB la BADH participa en el catabolismo de poliaminas, la síntesis del neurotransmisor inhibidor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y biosíntesis de carnitina (Yancey y col., 1982). La regulación de la actividad de BADH en respuesta al estrés osmótico se ha documentado en bacterias y algunas plantas (Falkenberg y Strøm, 1990; Ishitani y col., 1995), donde GB actúa como efector osmótico dentro de la célula.

Estudios realizados respecto a la distribución del mRNA y proteína, así como la actividad de betaina aldehído deshidrogenasa en tejido cardíaco en humanos, demostró que su distribución es consistente con la función fisiológica en la síntesis del osmolito GB. El estudio demostró que la actividad más alta se presentó en hígado y glándula adrenal, una actividad 4.2 veces más alta en comparación con músculo cardíaco (Izaguirre y Prietruszko, 1997). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para conocer los niveles de BADH bajo condiciones de estrés, como la hipertrofia cardíaca fisiológica.

## JUSTIFICACIÓN

La hipertrofia cardíaca fisiológica se presenta en respuestas fisiológicas adaptativas que son reversibles como el entrenamiento físico y embarazo. El proceso de adaptación requiere de la activación de vías de señalización intracelular para conservar las funciones contráctiles y conversión mecánica de los miocitos en respuesta al aumento de estrés por la hipertrofia. Se ha descrito la participación de GB en procesos de osmoregulación, osmoprotección y donación de grupos metilo durante enfermedades cardiovasculares. A su vez, se ha identificado a la enzima BADH, como la vía encargada de catalizar el producto de GB. Se ha estudiado ampliamente la caracterización y distribución tejido específico de ALDH9 en rata, destacando que, en condiciones normales se encuentra en bajos niveles de concentración. Sin embargo, se desconoce la concentración de BADH durante la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el embarazo y su proceso reversible en el posparto. Por lo anterior, en este trabajo se cuantificó la concentración de BADH antes, durante y después del embarazo en ventrículo izquierdo de rata.

## **HIPÓTESIS**

La concentración de la BADH aumenta durante el embarazo en ventrículo izquierdo de rata, y disminuye en el posparto.

## **OBJETIVOS**

Cuantificar el nivel proteico de BADH durante hipertrofia cardiaca fisiológica inducida por el embarazo en ventrículo izquierdo de rata.

### **Objetivos Específicos**

- Detectar la BADH mediante el método de Western Blot en extractos citoplasmáticos de ventrículo izquierdo de rata antes, durante y después del embarazo.
- Cuantificar la BADH mediante la tecnología libre de tinción del sistema ChemiDoc Touch Stain-Free Enabled Imaging Systems.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Manejo de animales y colección de muestras.**

Se utilizaron en el estudio ratas hembras Sprague-Dawley de tres meses de edad que fueron separadas en los siguientes grupos: Controles o no preñadas (**NP**), preñez temprana (**P12**), preñez tardía (**P18**), ratas postparto (**PP**). Todas las ratas fueron provistas con agua y alimento, se mantuvieron individualmente en cajas de acrílico, proporcionándoles 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con una temperatura y humedad promedio de 24 – 25 °C y 60 – 70%, respectivamente.

Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con 50 mg/kg de pentobarbital sódico antes de ser sacrificadas. Inmediatamente se realizó la extracción de corazón y la disección de ambos ventrículos (izquierdo y derecho), los cuales fueron congelados rápidamente y almacenados a -80° C para los análisis posteriores.

### **Extracción y cuantificación de proteínas citoplasmáticas.**

La obtención de proteínas citoplasmáticas se realizó utilizando el kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoFisher Scientific), a los cuales se les adiciono fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y coctel inhibidor de proteasas (Sigma, P8340) para evitar la degradación de las proteínas.

Se homogenizaron 20 mg de ventrículo izquierdo en 100 µL del buffer de extracción citoplasmática I (CER I) usando el homogeneizador POLYTRON PT 10-35 GT (Kinematica), se mezcló el contenido usando el Vortex Mixer (Fisher Scientific) posteriormente se incubó en hielo durante 10 min, se agregaron 5.5 µL de buffer de extracción citoplasmática II (CER II) y se mezcló el contenido usando el vortex. Posteriormente, se incubó en hielo durante 1 min y se centrifugó 5 min/13,500 RPM/4 °C. Finalmente, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almaceno a -80C.

La cuantificación de las proteínas se realizó usando el reactivo Quick Start Bradford (Bio-Rad) a partir de una dilución única (1:20, extracto:H<sub>2</sub>O) que fue dividida en dos alícuotas para su evaluación. Se realizó una mezcla del extracto con el reactivo Bradford, se incubó 5 minutos a 25°C y se midió la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro 67 Series, 670 UV/vis Spectrophotometer (Jenway). La concentración de proteína se determinó utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino de 0.125 a 2 mg/mL.

#### **Detección del nivel de proteína de BADH (ALDH9A1) mediante Western Blot.**

Se mezclaron 20 µg de proteína citoplasmática con buffer Laemmli, se hirvieron (90°C x 10 minutos) y se cargaron en geles SDS-TGX-Stain-Free 10%, se separaron en condiciones electroforéticas de 120 V por 40 minutos, fueron documentados para verificar la separación de proteínas usando el equipo ChemiDoc MP system. Las proteínas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) usando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo aplicando un campo eléctrico de 2.5 A constante hasta 25 V por 15 minutos (Bio-Rad), posteriormente se documentaron los geles para verificar la transferencia de proteínas.

Las membranas de PVDF se bloquearon a temperatura ambiente durante 1.5 horas con Tris Buffered Saline-Tween 20 (TBS-T) y caseína al 1% (Bio-Rad, 1706404), se realizaron 3 lavados con TBS-T y se incubaron a 4°C durante la noche (24 horas) con el anticuerpo primario anti-ALDH9a1 (Abcam ab79726) diluido a 1:1,000 en TBS-T caseína al 1%. Las membranas se lavaron por triplicado en intervalos de 8 minutos con TBS-T y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario IgG cabra anti-conejo diluido 1:20,000 en TBS-T caseína al 1%.

Las proteínas transferidas a la membrana e incubadas con los anticuerpos fueron detectadas por método de quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones para la preparación de substrato Clarity Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad Cat. No. 1705060). Las membranas fueron visualizadas usando el sistema Chemi-Doc XRS (Bio-Rad Laboratorios), se analizó la cuantificación de las proteínas usando el software Image-Lab 5.2.1 (Analysis tool

box), las densidades de las bandas fueron normalizadas acorde a la guía Western Blot Normalization With Image-Lab y la evaluación del rango de linealidad en base a la concentración preparada y detectada en geles de poliacrilamida.

### **Cuantificación de la concentración de BADH mediante la tecnología libre de tinción.**

La normalización total de proteína a través de la tecnología libre de tinción aplicada en la metodología de Western Blot con el uso de geles TGX-Stain-Free, inició con la obtención de una imagen en donde se superpone la corrida electroforética y la correspondiente a las proteínas en la membrana PVDF. El análisis con el software Image-Lab, requiere la cuantificación de las intensidades de todas las bandas contenidas en un carril del gel, que se representa como proteína total. La intensidad capturada, se analiza en contraste con la intensidad de cada una de las bandas correspondientes a la enzima de interés, llevando a cabo el proceso de normalización respecto al control.

### **Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar en donde se analizaron los diferentes grupos. El análisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo en el software Origin Lab 9.0 (OriginLab, Northampton, MA) con un factor de comparación de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) y Fisher LSD (Least Significant Difference) empleando un nivel de confianza del 95% y a las ratas no preñadas como control. Se comprobó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogórov-Smirnov.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cuantificación de BADH (ALDH9a1) en ventrículo izquierdo de rata durante la hipertrofia cardíaca fisiológica.

Se realizó un control de carga en gel de poliacrilamida TGX-Stain-Free de cada una de las muestras de los tratamientos (Fig. 5), en donde se muestra el perfil de bandas y la homogeneidad entre los grupos. En cada carril se cargó 20  $\mu\text{g}$  de proteína total correspondiente cada uno de los grupos (NP, P12, P18 y PP), para la cuantificación de BADH en ventrículo izquierdo de rata mediante Western Blot. La incubación de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF con anticuerpo primario Anti-ALDH9a1 (dilución 1:1,000) y el anticuerpo secundario (dilución 1:20,000) muestra la interacción específica detectada a los 54 KDa la cual corresponde a la subunidad de la BADH en todas las muestras (Fig. 6).

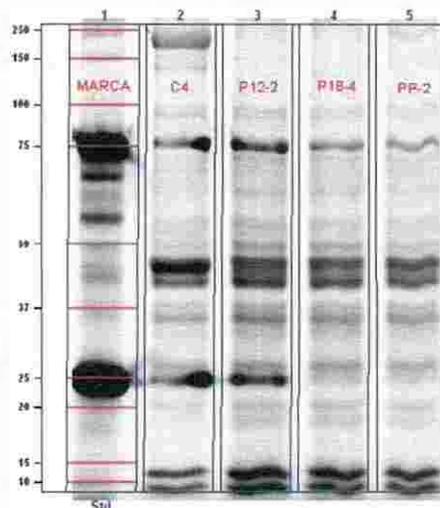


Figura 5. Análisis de concentración de proteínas en geles TGX-Stain-Free utilizando el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standars 250 KDa.

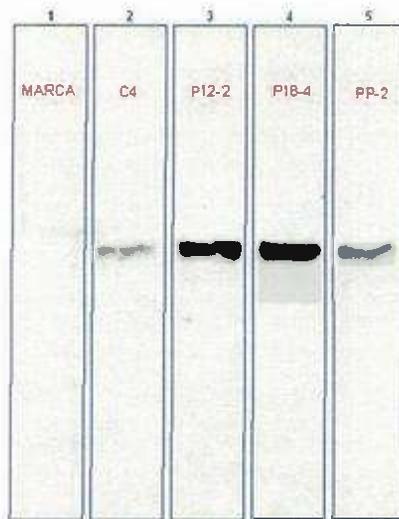


Figura 6. Inmunodetección de bandas de BADH a 54 KDa con anticuerpo Anti-ALDH9a1 en membranas de PVDF.

En el análisis de normalización de datos, fue posible superponer las proteínas en sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) con la respuesta de la interacción de proteína-anticuerpo obtenida por quimioluminiscencia (Fig. 7). Con ello, se confirma que el peso molecular de la banda que presentó interacción con el anticuerpo, corresponde al descrito para la BADH. A su vez, los resultados de la correlación entre la proteína total cargada en el gel y la intensidad total registrada por carril, presentó un índice de correlación de  $R^2= 0.9775$  (Fig. 8). Además, se evaluó la respuesta de linealidad de la señal quimioluminiscente del anticuerpo Anti-ALDH9a1 con la proteína BADH obteniendo una índice de correlación de  $R^2= 0.9389$  (Fig. 9). La correlación del control de carga y la señal con el anticuerpo, demuestran que la BADH puede ser detectada mediante Western-Blot y cuantificada mediante el protocolo descrito en la normalización de datos de la tecnología libre de tinción. La tecnología libre de tinción tiene que ser estandarizada para la evaluación de cada proteína, debido a que se deben verificar la señales de manera independiente, como lo reporta la literatura (Gürtler y col., 2013).

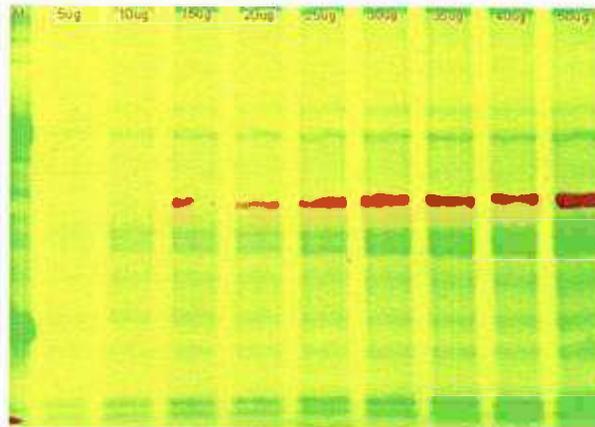


Figura 7. Control de carga SDS-PAGE (verde) e inmunodetección de BADH en membrana de PVDF (Rojo), con variante de concentración proteínica. Carril 1 marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards 250 KDa, carril 2 grupo P18 [5 µg], carril 3 grupo P18 [10 µg], carril 4 grupo P18 [15 µg], carril 5 grupo P18 [20 µg], carril 6 grupo P18 [25 µg], carril 7 grupo P18 [30 µg], carril 8 grupo P18 [35 µg], carril 9 grupo P18 [40 µg] y carril 10 grupo P18 [50 µg].

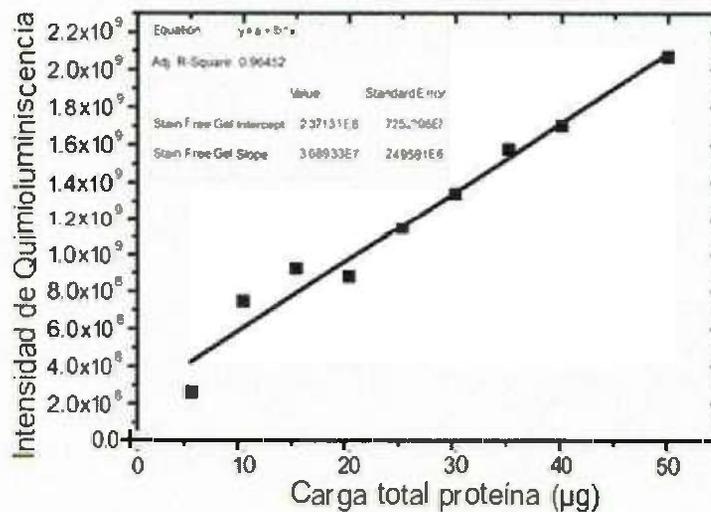


Figura 8. Análisis de la correlación de carga total de proteína en SDS-PAGE y volumen (intensidad) en gel libre de tinción.

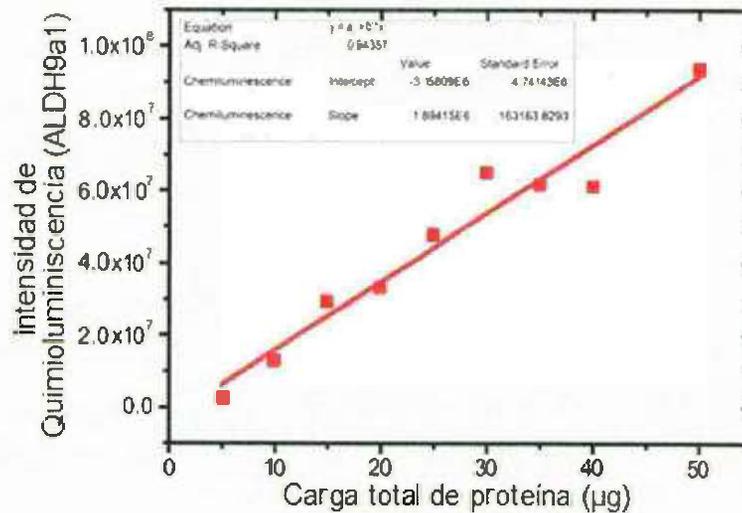


Figura 9. Análisis de la correlación de carga total de proteína en SDS-PAGE y volumen (intensidad) del anticuerpo ALDH9A1.

Los resultados en la cuantificación de los niveles de BADH a los distintos estadios muestran que no hay una diferencia en P12 respecto a NP (Fig. 10). Sin embargo, los niveles de BADH aumentaron 1.95 veces durante P18 respecto a NP y disminuyen por debajo de los niveles basales durante el PP. Los resultados obtenidos, concuerdan con los generados en nuestro grupo de trabajo, en donde, el nivel de expresión de mRNA de BADH aumentó 2.55 veces durante P18 en comparación con NP y los niveles disminuyeron a niveles basales durante el PP. Así mismo, la actividad enzimática de BADH aumentó 1.65 veces en P18 respecto a NP. Incluso, GB aumentó 1.53 veces en P18 y permanecieron aumentados 1.40 veces durante PP en contraste con NP.

Integrando toda la información generada, se indica que la expresión del mRNA para BADH en la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el embarazo se activa desde la etapa temprana de la preñez, pero es durante la preñez tardía en donde se presentan los mayores niveles de expresión, proteína y actividad de BADH y a su vez, una mayor acumulación del osmolito GB. El comportamiento de BADH va acorde a la función descrita durante

enfermedades cardiovasculares, brindando protección a las células cardíacas en eventos de osmoprotección, osmoregulación y reducción de riesgos vasculares.

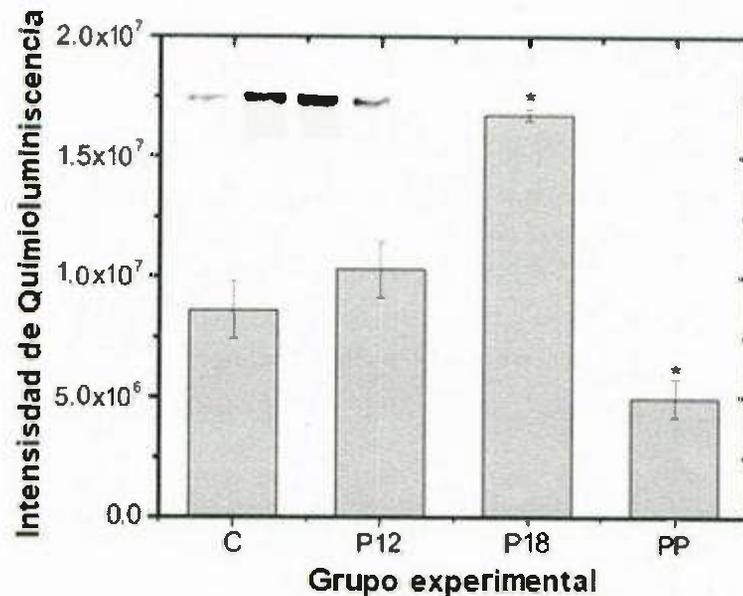


Figura 10. Cuantificación de BADH mediante la tecnología libre de tinción en las muestras C, P12, P18 Y PP. Los asteriscos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) respecto al control (C).

Es importante destacar, que en la literatura no se encuentran reportes de los niveles de BADH ante alteraciones cardíacas. De hecho, los estudios de enzimas deshidrogenasas son escasos. La única que hasta al momento se ha investigado y relacionado con la hipertrofia cardíaca es la enzima ALDH2 (Campos y col., 2015), implicada en la desintoxicación de aldehídos reactivos e involucrada en el metabolismo de etanol. En el estudio, la elevación de la ALDH2 en ratas hipertensas presentaron mejor funcionamiento ventricular, además, brinda protección en enfermedades cardiovasculares y miocardiopatía alcohólica, la elevación de ALDH2 se relaciona con un efecto cardioprotector y la reducción del daño isquémico evitando los eventos de apoptosis en cardiomiocitos (Gomes y col., 2014).

En nuestros resultados obtuvimos incremento de los niveles de actividad, proteína y mRNA de BADH durante la hipertrofia cardíaca fisiológica, sugiriendo que BADH regula los

niveles de GB para brindar protección a los miocitos ante la adaptación del desafío hiposmótico y mejoramiento en la permeabilidad de las células cardíacas. Durante las condiciones de estrés los osmolitos se encargan de regular el flujo del volumen celular en beneficio de las células, GB depende directamente de la actividad de BADH, por lo que el incremento de BADH repercute en el aumento de concentración y acumulación de GB en el tejido cardíaco. Además, Lever y Slow (2010) destacan la importancia de este osmolito como donador de grupos metilo, que aporta grandes beneficios en la reemetilación de homocisteína, favoreciendo la reducción de efectos adversos durante la presencia de enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, se sabe que la acumulación de aldehídos tóxicos está relacionado con la progresión de enfermedades cardiovasculares crónicas, en contraste la síntesis de GB reduce la acumulación de aldehídos tóxicos de tal manera que evita el agotamiento de glutatión y el desarrollo de estrés oxidativo (Conklin y Bhatnagar, 2010). Nuestros resultados indican que la enzima BADH puede estar participando en el mecanismo de respuesta y adaptación durante la hipertrofia cardíaca fisiológica causada por el embarazo, para la producción de GB y su efecto de ayudar en la regulación del volumen celular ante condiciones de estrés.

## **CONCLUSIÓN**

Se demostró que los niveles de BADH aumentan durante la preñez tardía, con un efecto reversible en el posparto. Lo anterior, sugiere que BADH participa en la respuesta adaptativa de la hipertrofia cardíaca fisiológica, acorde a las funciones de GB en la regulación del volumen celular de protección a los miocitos y reducción de homocisteína. Sin embargo, es necesario continuar los estudios para valorar la regulación e impacto de la enzima BADH en el mecanismo de adaptación a hipertrofia fisiológica.

## Bibliografía

- Ambroziak W, Kurys G, Pietruszko R. 1991. Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2. 1.3): comparison of subcellular localization of the third isozyme that dehydrogenates gamma-aminobutyraldehyde in rat, guinea pig and human liver. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 100(2), 321-327.
- Ambroziak W, Pietruszko R. 1991. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20), 13011-13018.
- Assayag P, Cafré F, Chevalier B, Delcayre C, Mansier P, Swynghedauw B. 1997. Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis. *Cardiovascular research*, 34(3), 439-444.
- Baylis C, Reckelhoff JF. 1991. Renal hemodynamics in normal and hypertensive pregnancy: lessons from micropuncture. *American journal of kidney diseases*, 17(2), 98-104.
- Boyd LA, Adam L, Pelcher LE, McHughen A, Hirji R, Selvaraj G. 1991. Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH. *Gene*, 103(1), 45-52.
- Brouquisse R, Weigel P, Rhodes D, Yocum CF, Hanson AD. 1989. Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiology*, 90(1), 322-329.
- Campos JC, Fernandes T, Bechara LRG, Paixão NAd, Brum PC, Oliveira Emd, Ferreira JCB. 2015. Increased clearance of reactive aldehydes and damaged proteins in hypertension-induced compensated cardiac hypertrophy: impact of exercise training. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Cánovas D, Vargas C, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ. 1998. Synthesis of glycine betaine from exogenous choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 4095-4097.
- Capeless EL, Clapp JF. 1989. Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 161(6), 1449-1453.
- Carreño JE, Apablaza F, Ocañanza MP, Jalil JE. 2006. Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Revista Española de Cardiología*, 59(5), 473-486.
- Cingolani HE, Perez NG, Aiello EA, Ennis IL, Garciaena CD, Villa-Abrille MC, Dulce RA, Caldiz CI, Yeves AM, Correa MV. 2008. Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1. *Front Biosci*, 13, 7096-7114.
- Cingolani OH, Pérez NG, Ennis IL, Álvarez MC, Mosca SM, Schinella GR, Escudero EM, Cónsole G, Cingolani HE. 2011. In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 462(5), 733.
- Clares RAM, García RV. 2004. GENIO Y FIGURA DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, 28.
- Conklin D, Bhatnagar A. 2010. Aldehydes and cardiovascular disease.
- Chapman SJ, Owen J, Hauth JC. 1997. One-versus two-layer closure of a low transverse cesarean: the next pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 89(1), 16-18.
- Chern M-K, Pietruszko R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 213(2), 561-568.
- Christianson RE. 1976. Studies on blood pressure during pregnancy: I. influence of parity and age. *American journal of obstetrics and gynecology*, 125(4), 509-513.

- Chung E, Leinwand LA. 2014. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular research*, 101(4), 561-570.
- De Zwart F, Slow S, Payne R, Lever M, George P, Gerrard J, Chambers S. 2003. Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. *Food Chemistry*, 83(2), 197-204.
- Dragolovich J, Pierce SK. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 270(5), 417-425.
- Ennis I, Nolly M, Pinilla O, Garciarena C, Carranza V, Piaggio M, Escudero E, Cingolani H. (2008). *Physiologic cardiac hypertrophy: impact of its development upon a model of pathologic hypertrophy*. Paper presented at the Circulation.
- Falkenberg P, Strøm AR. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1034(3), 253-259.
- Feng Y, Müller V, Friedrich B, Risler T, Lang F. 2001. Clinical significance of cell volume regulation. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 113(13-14), 477-484.
- Frontiera MS, Stabler SP, Kolhouse JF, Allen RH. 1994. Regulation of methionine metabolism: effects of nitrous oxide and excess dietary methionine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(1), 28-38.
- George S, Venkataraman G, Parida A. 2007. Identification of stress-induced genes from the drought-tolerant plant *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. through analysis of expressed sequence tags. *Genome*, 50(5), 470-478.
- Gilson GJ, Mosher MD, Conrad KP. 1992. Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 263(6), H1911-H1918.
- Gilles R. 1997. "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(3), 279-290.
- Goldberg A, McCaman R. 1968. Betainealdehyde dehydrogenase: assay and partial purification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 167(1), 186-189.
- Gomes KM, Campos JC, Bechara LR, Queliconi B, Lima VM, Disatnik M-H, Magno P, Chen C-H, Brum PC, Kowaltowski AJ. 2014. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovascular research*, 103(4), 498-508.
- Greenfield NJ, Pietruszko R. 1977. Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 483(1), 35-45.
- Grossman W, Jones D, McLaurin L. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 56(1), 56.
- Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. 2013. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 433(2), 105-111.
- Hempel J, Nicholas H, Lindahl R. 1993. Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Science*, 2(11), 1890-1900.
- Herron TJ, Devaney E, Mundada L, Arden E, Day S, Guerrero-Serna G, Turner I, Westfall M, Metzger JM. 2010. Ca<sup>2+</sup>-independent positive molecular inotropy for failing rabbit and

- human cardiac muscle by  $\alpha$ -myosin motor gene transfer. *The FASEB Journal*, 24(2), 415-424.
- Hunter S, Robson SC. 1992. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *British heart journal*, 68(6), 540.
- Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant molecular biology*, 27(2), 307-315.
- Izaguirre G, Kikonyogo A, Pietruszko R. 1997. Tissue distribution of human aldehyde dehydrogenase E3 (ALDH9): comparison of enzyme activity with E3 protein and mRNA distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1), 59-64.
- Izaguirre G, Kikonyogo A, Pietruszko R. 1997. Tissue distribution of human aldehyde dehydrogenase E3 (ALDH9): comparison of enzyme activity with E3 protein and mRNA distribution. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 118(1), 59-64.
- Katz R, Karliner JS, Resnik R. 1978. Effects of a natural volume overload state (pregnancy) on left ventricular performance in normal human subjects. *Circulation*, 58(3), 434-441.
- Kaur K, Zarzoso M, Ponce-Balbuena D, Guerrero-Serna G, Hou L, Musa H, Jalife J. 2013. TGF- $\beta$ 1, released by myofibroblasts, differentially regulates transcription and function of sodium and potassium channels in adult rat ventricular myocytes. *PLoS one*, 8(2), e55391.
- Kikonyogo A, Pietruszko R. 1996. Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates  $\gamma$ -aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution. *Biochemical Journal*, 316(1), 317-324.
- Kurys G, Ambroziak W, Pietruszko R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low  $K_m$  for  $\gamma$ -aminobutyraldehyde. *Journal of Biological Chemistry*, 264(8), 4715-4721.
- Lamark T, Kaasen I, Eshoo M, Falkenberg P, McDougall J, Strøm A. 1991. DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline—glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 5(5), 1049-1064.
- Landfald B, Strøm AR. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 165(3), 849-855.
- Lang R, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J. 2006. Recommendations for chamber quantification. *European journal of echocardiography*, 7(2), 79-108.
- Lang. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Journal of the American college of nutrition*, 26(sup5), 613S-623S.
- Lee P, Klos M, Bollensdorff C, Hou L, Ewart P, Kamp TJ, Zhang J, Bizy A, Guerrero-Serna G, Kohl P. 2012. Simultaneous voltage and calcium mapping of genetically purified human induced pluripotent stem cell-derived cardiac myocyte monolayers: novelty and significance. *Circulation research*, 110(12), 1556-1563.
- Lever M, Slow S. 2010. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical biochemistry*, 43(9), 732-744.
- Mabie WC, Sibai BM. 1994. Hypertensive states of pregnancy. *Current Obstetric and Gynecologic Diagnosis and Treatment. Connecticut: Appelton and Lange*, 380-397.
- Macaya CM. (2007). *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA: Fundación BBVA*.

- McCue KF, Hanson AD. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology*, 8, 358-362.
- Mehrotra A, Joe B, de la Serna IL. 2013. SWI/SNF chromatin remodeling enzymes are associated with cardiac hypertrophy in a genetic rat model of hypertension. *Journal of cellular physiology*, 228(12), 2337-2342.
- Merkle S, Frantz S, Schön MP, Bauersachs J, Buitrago M, Frost RJ, Schmitteckert EM, Lohse MJ, Engelhardt S. 2007. A role for caspase-1 in heart failure. *Circulation research*, 100(5), 645-653.
- Nagatomo Y, Carabello BA, Hamawaki M, Nemoto S, Matsuo T, McDermott PJ. 1999. Translational mechanisms accelerate the rate of protein synthesis during canine pressure-overload hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(6), H2176-H2184.
- Narula J, Chandrasekhar Y, Dec G. 1998. Apoptosis in heart failure: a tale of heightened expectations, unfulfilled promises and broken hearts. *Apoptosis*, 3(5), 309-315.
- Pietruszko R, Chern M-K. 2001. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. *Chemico-biological interactions*, 130, 193-199.
- Purizaca M. 2010. Modificaciones fisiológicas en el embarazo. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 56(1).
- Ryzjak MT, Pietruszko R. 1988. Human brain "high Km" aldehyde dehydrogenase: purification, characterization, and identification as NAD<sup>+</sup>-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 266(2), 386-396.
- Sakamoto A, Murata N. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 81-88.
- Sánchez A, Riveros-Rosas H, Martínez-Castilla LP, Velasco-García R, Muñoz-Clares RA. 2007. Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 13, 64-76.
- Scheibler C. 1869. Über das Betain, eine im Saft der Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) vorkommende Pflanzenbase. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2(1), 292-295.
- Scheibler C. 1870. Ueber das Betain und seine Constitution. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 3(1), 155-161.
- Schliess F, Häussinger D. 2002. The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biological chemistry*, 383(3-4), 577-583.
- Slangen BF, Out IC, Janssen BJ, Peeters LL. 1997. Blood pressure and heart rate variability in early pregnancy in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 273(4), H1794-H1799.
- Smolin L, Benevenga N. 1989. Methionine, homocysteine, cysteine-metabolic interrelationships. *Absorption and utilization of amino acids*, 1, 155-187.
- Spaanderman, van, Ekhart, Van Eyck, Cheriex, De Leeuw, Peeters. 2000. Changes in hemodynamic parameters and volume homeostasis with the menstrual cycle among women with a history of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 182(5), 1127-1134.
- Spaanderman M, Ekhart T, Van Eyck J, Cheriex E, De Leeuw P, Peeters L. 2000. Latent hemodynamic abnormalities in symptom-free women with a history of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 182(1), 101-107.
- Stryer L. 1995. Biochemistry, 1995. New York, NY: WH Freeman and Co, Fourth Google Scholar.

- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH. 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, 35(4), 452-464.
- Sunthareswaran R. (1999). *Cursos Crash de Mosby. Lo esencial en Sistema Cardiovascular*: Madrid: Ediciones Harcourt España.
- Valeñzuela-Soto EM, Muñoz-Clares RA. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *Journal of plant physiology*, 143(2), 145-152.
- Vaz FM, Fouchier SW, Ofman R, Sommer M, Wanders RJ. 2000. Molecular and biochemical characterization of rat  $\gamma$ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7390-7394.
- Venkatesu P, Lee M-J, Lin H-m. 2009. Osmolyte counteracts urea-induced denaturation of  $\alpha$ -chymotrypsin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(15), 5327-5338.
- Villamil A, Zilberman J. (2000). Hipertrofia ventricular izquierda y su regresión en la hipertensión arterial [en internet] 2000 [citado 20 de diciembre de 2005] Disponible en: <http://>
- Weigel P, Weretilnyk EA, Hanson AD. 1986. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiology*, 82(3), 753-759.
- Wilken DR, McMacken ML, Rodriguez A. 1970. Choline and betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 216(2), 305-317.
- Wilkins BJ, Molkentin JD. 2002. Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going? *The Journal of physiology*, 541(1), 1-8.
- Wright AR, Rees SA. 1998. Cardiac cell volume: crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types. *Pharmacology & therapeutics*, 80(1), 89-121.
- Yancey PH. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15), 2819-2830.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.
- Yancey PH, Somero GN. 1979. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochemical Journal*, 183(2), 317-323.
- Yannone ME. 1972. Hormonal Changes in Pregnancy. *MCV/Q, Medical College of Virginia Quarterly*, 8(1), 43-51.