



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

TITULO DE LA TESIS:

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA D-AMINOÁCIDO OXIDASA
EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA”.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO

PRESENTADO POR:

JERZAÍN MORENO ARCINEAGA

ASESOR DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICHOACÁN

AGOSTO 2007

DEDICATORIA.

A **Dios** por haberme permitido vivir lo suficiente para lograr terminar mi carrera con bien.

A mis padres: **Saraín y Concepción**, por haberme apoyado y educado de la manera en como lo hicieron, así como por la ayuda y el cariño que me han brindado.

A mis hermanas: **Eunice y Tania**, porque siempre me han ayudado al alcance de sus posibilidades.

A mi familia por creer siempre en mí.

Al D.C. **Alfredo Saavedra Molina** y a **Mónica Clemente Guerrero**, así como a los compañeros del laboratorio de Bioquímica del IIQB, por ayudarme en la realización de este trabajo.

CONTENIDOS

	Pág.
Dedicatoria	i
Indice	ii
Lista de Tablas	iii
Lista de Figuras	iii
Agradecimientos	v
Capítulo	Pág.
1 Resumen	1
2 Introducción	3
2.1 Cerebro	3
2.1.1 Neurotransmisores	5
2.2 Mitocondrias	8
2.3 Flavoproteínas	11
2.4 D-Aminoácido oxidasa	11
2.5 Aminoácidos	13
2.5.1 Propiedades generales de los aminoácidos	14
2.6 D-Aminoácidos	17
2.6.1 Ubicación de los D-aminoácidos dentro de la dieta alimentaria	18
2.6.2 Función de los D-aminoácidos	19
2.7 Antecedentes	20
3 Hipótesis	23
4 Objetivos	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5 Materiales y métodos	24
5.1 Reactivos	24
5.2 Material biológico	24
5.3 Aislamiento de mitocondrias	24
5.4 Medición de la actividad de la D-aminoácido oxidasa	25
5.5 Procesamiento estadístico	26

6 Resultados	27
6.1 Efecto del tiempo en la actividad de la D-aminoácido oxidasa	27
6.2 Efecto de la temperatura en la actividad de la D-aminoácido oxidasa	29
6.3 Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la D-aminoácido oxidasa mitocondrial de cerebro de rata.	31
6.3.1 Comparación del efecto de la concentración de los sustratos en la actividad de la D-aminoácido oxidasa	31
6.3.1.1 Efecto con D-Alanina	31
6.3.1.2 Efecto con D-Serina	33
6.3.1.3 Efecto con D-Metionina	34
6.3.1.4 Efecto con D-Aspartato	35
6.4 Efecto del pH en la actividad de la D-aminoácido oxidasa	36
6.5 Cinética de la D-Aminoácido Oxidasa de mitocondrias de cerebro de rata	39
7 Discusión	41
8 Conclusiones	44
9 Bibliografía	45

Lista de Tablas	Pág.
1. Clasificación de neurotransmisores	7
2. Pk's de los distintos aminoácidos utilizados durante este trabajo	16
3. Valores de velocidad máxima y Km	39

Lista de Figuras.	Pág.
1. Cortes longitudinal y transversal del cerebro	4
2. Micrografía electrónica del corte longitudinal de una mitocondria	9
3. Estructura tridimensional de la D-aminoácido oxidasa	12
4. Mecanismo de reacción de la D-aminoácido oxidasa	13
5. Estructura general de los aminoácidos y sus características	15
6. Punto isoeléctrico, formación de las formas catiónica, aniónica y zwitteriónica de un aminoácido	16
7. Racemización de los D-aminoácidos catalizada por bases	18
8. Efecto del tiempo sobre la actividad de la D-Aminoácido oxidasa	28
9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la D-aminoácido oxidasa	30
10. Efecto de la concentración de D-Ala sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata	32
11. Efecto de la concentración de D-Ser sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata	33
12. Efecto de la concentración de D-Met sobre la actividad de la D-AAO en	34

mitocondrias de cerebro de rata	
13. Efecto de la concentración de D-Asp sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata	35
14. Efecto del pH sobre la actividad de la D-AAO en presencia de: D-Ala (A), D-Ser (B), D-Met (C) y D-Asp (D)	38
15. Cinética de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata	40

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, **Saraín Moreno González** y **Ma. Concepción Arcineaga Madrigal**, por su amor y apoyo durante toda mi vida.

Al **D.C. Alfredo Saavedra Molina** y a la **Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero**, por el apoyo, la asesoría y la amistad que me dieron durante la realización de mi servicio social y el transcurso de este trabajo.

A mis sinodales, **D.C. Salvador Manzo Ávalos**, **M.C. Elizabeth Calderón Cortés**, **D.C. Consuelo Cortés Penagos** y al **D.C. Carlos Cervantes** por sus aportaciones, sugerencias y consejos para la realización del manuscrito final de esta tesis.

A **Paulina R.H.** por su apoyo durante la carrera y su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

Al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas** por las facilidades otorgadas para este trabajo de investigación.

Al **CONACYT** (43705) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto; Fondos Mixtos, gob. edo. de Michoacán-CONACYT (64277); CIC-UMSNH (2.16)

1 RESUMEN

En este trabajo se estudió la actividad de la enzima D-aminoácido oxidasa (DAAO) en las mitocondrias de cerebro de rata. Datos preliminares sugieren la oxidación de D-aminoácidos en mitocondrias, por lo que se procedió a la determinación de la actividad de la DAAO en presencia de los D-aminoácidos: D-Alanina (D-Ala), D-Serina (D-Ser), D-Metionina (D-Met) y D-Ácido aspártico (D-Asp). En mitocondrias bajo condiciones normales a distintos tiempos, temperaturas, concentraciones de sustrato y a un pH distinto. Las pruebas que se realizaron empleando ratas de entre 2 y 4 meses de edad.

Los resultados que se obtuvieron demostraron que la D-aminoácido oxidasa tiene una mayor afinidad por la D-alanina, presentándose una actividad superior que con los otros D-aminoácidos estudiados. Esto fue similar en todas las variaciones en las cuales se realizaron las pruebas.

La mayor actividad específica se encontró a los 10 minutos de iniciada la reacción con los cuatro D-aminoácidos tendiendo todas a un incremento en 10 min y luego una caída.

Se pudo observar también el comportamiento que presentaron los D-aminoácidos a una temperatura de 37°C, donde a comparación con la temperatura de 30°C, la actividad de la DAAO disminuyó con D-alanina, mientras que con D-serina, D-Metionina y D-Aspartato presentaron un aumento. Mientras que a 30°C ocurre lo contrario.

Al variar la concentración del sustrato, se observó que la mayor actividad se da a una concentración de 0.1 M para D-Ala y D-Asp, mientras que para D-Ser y D-Met la mayor actividad se presenta a una concentración de 0.2 M. La menor actividad se obtuvo a una concentración de 0.05 M en donde el D-Asp presentó una actividad apenas perceptible y la actividad con D-Ser fue nula.

Al variar el pH del medio de reacción ya fuera ácido o básico, se observó una caída de la actividad, resultando que la mejor actividad se llevó a cabo a un pH neutro (7.0).

2 INTRODUCCION

2.1 CEREBRO

El cerebro es parte del sistema nervioso central de los vertebrados que está dentro del cráneo. En los humanos adultos pesa aproximadamente 1,3 Kg. y es una masa de tejido gris-rosáceo compuesta por unas 100.000 millones de células nerviosas, conectadas unas con otras y responsables del control de todas las funciones mentales. Además de las células nerviosas (neuronas), el cerebro contiene células de la glía (células de soporte), vasos sanguíneos y órganos secretores.

El cerebro constituye la masa principal del encéfalo y es el lugar donde llegan las señales procedentes de los órganos de los sentidos y de las terminaciones nerviosas (19). **(Fig. 1)** Este se origina a partir del prosencéfalo o cerebro anterior, que después, en una nueva división, dará lugar al telencéfalo y al diencefalo. El telencéfalo está constituido principalmente por la corteza cerebral, esta ocupa la mayor parte del cerebro humano y es cerca del 85% del peso cerebral. (12).

El cerebro es la división mayor y más alta del encéfalo. Un surco profundo lo divide en 2 mitades, los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. Otras fisuras subdividen a cada hemisferio cerebral en cuatro lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital. Cada hemisferio cerebral esta constituido por sustancia gris externa, sustancia blanca interna e islotes de sustancia gris interna. El cuerpo calloso es un conglomerado de fibras nerviosas blancas que conectan estos dos hemisferios y transfieren información de uno a otro. (6)(12).

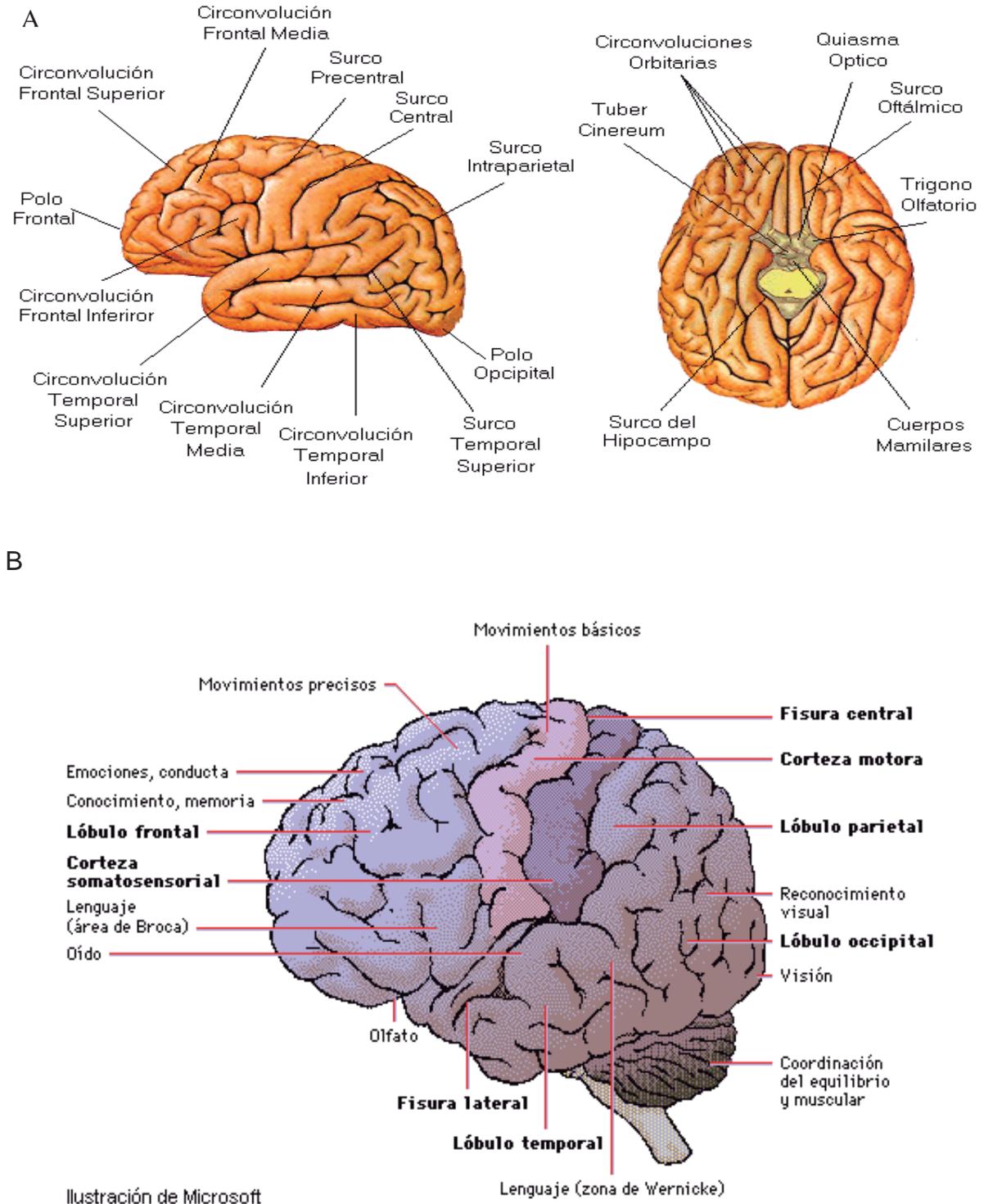


FIGURA 1. A) Cortes longitudinal y transversal del cerebro donde se puede observar distintos sitios del cerebro. B) Se observa un corte longitudinal del cerebro y se definen las funciones de la corteza cerebral de acuerdo a su posible punto de origen.

Cada hemisferio cerebral presenta una capa superficial de sustancia gris denominada corteza cerebral de unos 2 o 3 mm de espesor. La corteza está compuesta por capas de células amielínicas (sin vaina de mielina que las recubre), que cubren una sustancia interior de fibras mielínicas (con vaina blanca) denominada sustancia blanca. Las fibras mielínicas unen la corteza cerebral con otras partes del cerebro: la parte anterior del cerebro con la posterior, las diferentes zonas de la misma cara de la corteza cerebral y un lado del cerebro con el otro. (12).

Los tejidos del sistema nervioso están compuestos de dos clases principales de células: neuronas y neuroglia. Las neuronas se especializan en la conducción de impulsos, que hacen posibles todas las funciones del sistema nervioso. La neuroglia por otra parte, ejecuta las funciones menos especializadas de sostén y protección; se han identificado a los astrocitos, oligodendroglia (ú oligopendria) y microglia.

Además, las células neuronales tienen estructuras especializadas como las dendritas, axones, neurofibrillas, cuerpos de Nissl, vaina de mielina y neurolema. Todos estos encargados de la neurotransmisión.

La célula nerviosa se parece a otras células. Contiene núcleo, citoplasma y diversos orgánulos que se encuentran en otras células (mitocondrias y aparato de Golgi). (6)

2.1.1 Neurotransmisores

Un neurotransmisor es una sustancia secretada por las neuronas y que difunde una corta distancia a las células blanco donde produce una respuesta fisiológica, como la contracción muscular. El neurotransmisor puede alterar el flujo iónico y producir despolarización o hiperpolarización, o puede alterar el metabolismo de la célula blanco (48).

Los procesos bioquímicos asociados con la neurotransmisión son:

- **Síntesis del neurotransmisor** por las neuronas presinápticas. A veces participan las células gliales. Según la naturaleza del neurotransmisor, éste se puede sintetizar en el soma neuronal o en las terminaciones nerviosas. Algunos neurotransmisores se sintetizan directamente en las terminaciones nerviosas gracias a enzimas que se han sintetizado en el soma y se han transportado a estas terminaciones. A través del interior del axón fluye una corriente de sustancias libres o encerradas en vesículas, que pueden ser precursores tanto de los neurotransmisores o sus enzimas, llamada flujo axónico.

- **Almacenamiento del neurotransmisor** en vesículas sinápticas.

- **Liberación del neurotransmisor** por exocitosis, que es calcio dependiente. Cuando llega un impulso nervioso a la neurona presináptica, ésta abre los canales de calcio, entrando el ión en la neurona y liberándose el neurotransmisor en el espacio sináptico. El calcio además de iniciar la exocitosis, activa el traslado de las vesículas a los lugares de su liberación con la ayuda de proteínas de membrana plasmática y de la membrana vesicular. Cuando entra el calcio en la neurona se activa una enzima llamada calmodulina que es una proteinquinasa, encargada de fosforilar a la sinapsina I situada en la membrana de las vesículas y que las une a los filamentos de actina. Cuando la sinapsina I es fosforilada las vesículas sinápticas se despegan de la actina y se movilizan hacia los sitios donde deban vaciarse. La fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática es un proceso complejo en la que intervienen varias proteínas como la sinaptobrevina, sinaptotagmina, rab-3 (de la membrana vesicular) syntaxina, SNAP-25, n-sec 1 (de la membrana plasmática) y factor sensible a n-etilmaleimida (NSF) con actividad ATP-asa. Este conjunto de proteínas forman el complejo SNARE que forma un poro en la membrana plasmática que permite la fusión de ambas membranas y la salida del contenido vesicular al espacio sináptico.

- **Activación del receptor del neurotransmisor** situado en la membrana plasmática de la neurona postsináptica. El receptor postsináptico es una estructura proteica que desencadena una respuesta. Los neurorreceptores pueden ser:

- Receptores inotrópicos: Producen una respuesta rápida al abrir o cerrar canales iónicos, que producen despolarizaciones o generando

potenciales de acción o respuestas excitatorias o producen hiperpolarizaciones o respuestas inhibitorias.

- **Receptores metabotrópicos:** Liberan mensajeros intracelulares, como AMP cíclico, calcio, y fosfolípidos por el mecanismo de transducción de señales.
 - Iniciación de las acciones del segundo mensajero.
 - **Inactivación del neurotransmisor**, ya sea por degradación química o por reabsorción en las membranas. En el espacio sináptico existen enzimas específicos que inactivan al neurotransmisor. Además las neuronas presinápticas tienen receptores para el neurotransmisor que lo recaptan introduciéndolo y almacenándolo de nuevo en vesículas para su posterior vertido.

Los neurotransmisores más conocidos son la acetilcolina, la norepinefrina, la dopamina y la serotonina. El gas óxido nítrico es también un neurotransmisor, con un especial mecanismo de acción que no cumple todas las características de los neurotransmisores. Algunos aminoácidos también actúan como neurotransmisores los mas estudiados son el Glutamato, la Glicina y el GABA, otros aminoácidos neurotransmisores menos conocidos son el N-metil-D-Aspartato y la D-Ser (18).

Algunos de los neurotransmisores se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Se muestran distintos aminoácidos, su ubicación dentro del cuerpo humano y su función a realizar.

CLASIFICACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Neurotransmisor	Localización	Función
Acetilcolina	Sinapsis con músculos y glándulas; muchas partes del sistema nervioso central (SNC)	Excitatorio o inhibitorio involucrado en la memoria
Serotonina	Varias regiones del sistema nervioso central (SNC)	Principalmente inhibitorio; sueño, involucrado en estados de ánimo y emociones
Dopamina	Encéfalo; sistema nervioso autónomo	Principalmente inhibitorio; involucrado en emociones/ánimo;

	(SNA)	regulación del control motor
Epinefrina	Áreas del sistema nervioso central (SNC) y división simpática del sistema nervioso autónomo (SNA)	Excitatorio o inhibitorio; hormona cuando es producido por la glándula adrenal
Norepinefrina	Áreas del sistema nervioso central (SNC) y división simpática del sistema nervioso autónomo (SNA)	Excitatorio o inhibitorio; regula efectores simpáticos; en el encéfalo involucrado en respuestas emocionales
Glutamato	Sistema nervioso central (SNC)	El neurotransmisor excitatorio más abundante (75%) del SNC
Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	Encéfalo	El neurotransmisor inhibitorio más abundante del encéfalo
Glicina	Médula espinal	El neurotransmisor inhibitorio más común de la médula espinal
D-Serina	Incierta	Ligando de los receptores del N-Metil-D-Aspartato
N-Metil-D-Aspartato	Sistema nervioso central (SNC)	Involucrado en el aprendizaje y la memoria

(20).

2.2 MITOCONDRIAS

Las mitocondrias son las centrales energéticas de la célula en las cuales los nutrientes son oxidados y la energía liberada de este modo es utilizada para la síntesis del ATP. (36).

En las células animales, la mitocondria es por lo general un orgánulo en forma de bacilo con longitud aproximada de 1.5 a 2 μm y un diámetro de 0.5 a 1 μm . Son más densas que el resto del material citoplásmico y en la centrifugación diferencial se separan como estructuras homogéneas con una composición aproximada de 70% de proteína, 29.5% de lípidos y 0.5% de ácidos nucleicos (33).

La mitocondria consiste de distintas regiones que son: una membrana externa y una interna, las cuales están separadas por un espacio intermembranal. Mientras

que la membrana externa es lisa y continua alrededor de la mitocondria, la interna forma extensos plegamientos irregulares en el interior de la mitocondria, llamadas crestas. El interior del orgánulo, lleno de líquido, recibe el nombre de matriz mitocondrial, la cual contiene DNA y ribosomas. La cantidad de DNA presente es pequeña, ya que solo representa del 2 al 4% del DNA total de la célula. El DNA mitocondrial contiene los genes que codifican algunas de las proteínas del orgánulo. La mayor parte de las proteínas mitocondriales son codificadas por los genes del DNA nuclear. (5). **(Fig. 2)**.

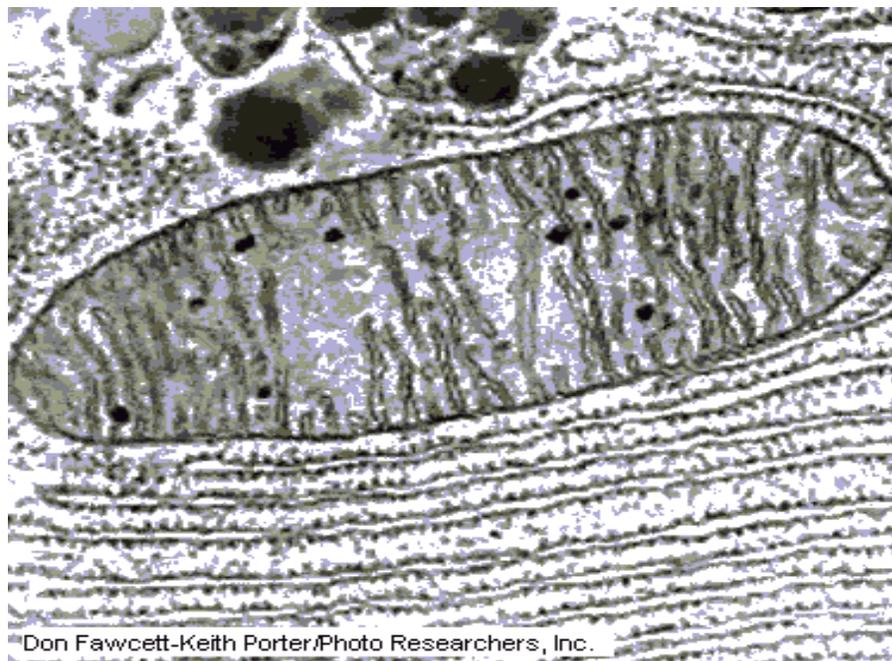


Figura 2. Micrografía electrónica del corte longitudinal de una mitocondria y del citoplasma circundante de una célula pancreática de murciélago. (5)

Estos orgánulos se encargan de la mayor parte del metabolismo aeróbico de la célula, que incluyen los procesos bioquímicos cruciales del ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa, Estos fenómenos producen casi toda la energía necesaria para el crecimiento y la viabilidad de la célula (5).

La principal función de las mitocondrias es generar energía para mantener la actividad celular. La glucosa se degrada en el citoplasma celular para formar

piruvato que penetra en la mitocondria. En una serie de reacciones, algunas de las cuales están dentro del ciclo de Krebs o del ácido cítrico. El piruvato reacciona con agua para producir dióxido de carbono y diez átomos de hidrógeno. Estos átomos de hidrógeno se transportan hasta las crestas de la membrana interna a lo largo de una cadena de moléculas especiales llamadas coenzimas [Flavin mononucleótido (FMN), Flavin adenin Dinucleótido (FAD), la coenzima Q, centros Hierro-Azufre y los citocromos (a, b y c)]. Una vez allí, las coenzimas donan los hidrógenos a una serie de proteínas enlazadas a la membrana que forman lo que se llama cadena de transporte de electrones.

La cadena transportadora de electrones separa los electrones y los protones de cada uno de los diez átomos de hidrógeno. Los diez electrones se envían a lo largo de la cadena y acaban por combinarse con oxígeno y los protones para formar agua.

La energía se libera a medida que los electrones pasan desde las coenzimas a los átomos de oxígeno y se almacena en compuestos de la cadena de transporte de electrones. A medida que éstos pasan de uno a otro, los componentes de la cadena bombean aleatoriamente protones desde la matriz hacia el espacio comprendido entre las membranas interna y externa. Los protones sólo pueden volver a la matriz por una vía compleja de proteínas integradas en la membrana interna. Este complejo permite a los protones volver a la matriz sólo si se añade un grupo fosfato al difosfato de adenosina (ADP) para formar ATP en un proceso llamado fosforilación oxidativa.

El ATP se libera en el citoplasma de la célula, que lo utiliza prácticamente en todas las reacciones que necesitan energía. En estos procesos, el ATP se convierte en ADP, que la célula devuelve a la mitocondria para volver a fosforilarlo. (48).

2.3 FLAVOPROTEÍNAS

Una flavoproteína es una apoenzima que, junto a su cofactor (FMN, FAD o derivados) fuertemente unido, cataliza una reacción generalmente de óxido-reducción en la que uno o dos electrones de un donador son transferidos transitoriamente al núcleo de isoaloxacina del cofactor y posteriormente a un aceptor de electrones.

El término oxidasa se refiere a aquellas oxido-reductasas que usan el oxígeno como aceptor de electrones. Todos los electrones retirados del donador son transferidos al O_2 para formar alguno de sus productos de reducción: [superóxido (O_2^{-2}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o agua H_2O]. (3)

2.5 D-AMINOACIDO OXIDASA

Además de la glutamato deshidrogenasa hay otras dos enzimas que oxidan a los aminoácidos a cetoácidos. Son la L-aminoácido oxidasa [con flavin mononucleótido (FMN) como cofactor] y la D-aminoácido oxidasa [con flavin adenin dinucleótido (FAD) como cofactor]. Estas enzimas se localizan en los peroxisomas y generan peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es degradado por la catalasa a oxígeno molecular y agua (48).

La D-aminoácido oxidasa pertenece a la familia de las flavoproteínas oxidasas debido a que dentro de su estructura se encuentra unida al cofactor Flavin Adenin Dinucleótido (FAD) (**Fig. 3**)



Figura 3. Estructura tridimensional de la D-aminoácido oxidasa

Esta enzima fue una de las primeras enzimas descritas y fue la segunda flavoproteína descubierta a mediados de 1930. (30)

La D-aminoácido oxidasa cataliza la deshidrogenación de los D-aminoácidos pasando por varios estadios como la formación de un complejo Michaeliano 1 y otro complejo 2 en donde el FAD se encuentra reducido, después este FAD reducido va a ser reoxidado por un bioxígeno, el cual va a oxidar al FAD y también va a formar peróxido de hidrógeno, el cual es degradado por la catalasa, dando así la formación del iminoácido el cual espontáneamente se hidrolizará a amoníaco y al α -cetoácido **(Fig. 4)**. Aunque la D-aminoácido oxidasa esta presente en organismos y tejidos

mamíferos, su rol fisiológico en vertebrados es aún confuso. Recientemente fue propuesto un rol específico de la D-aminoácido oxidasa en la regulación de la neurotransmisión, degradando al neurotransmisor, D-serina, en el cerebro (54).

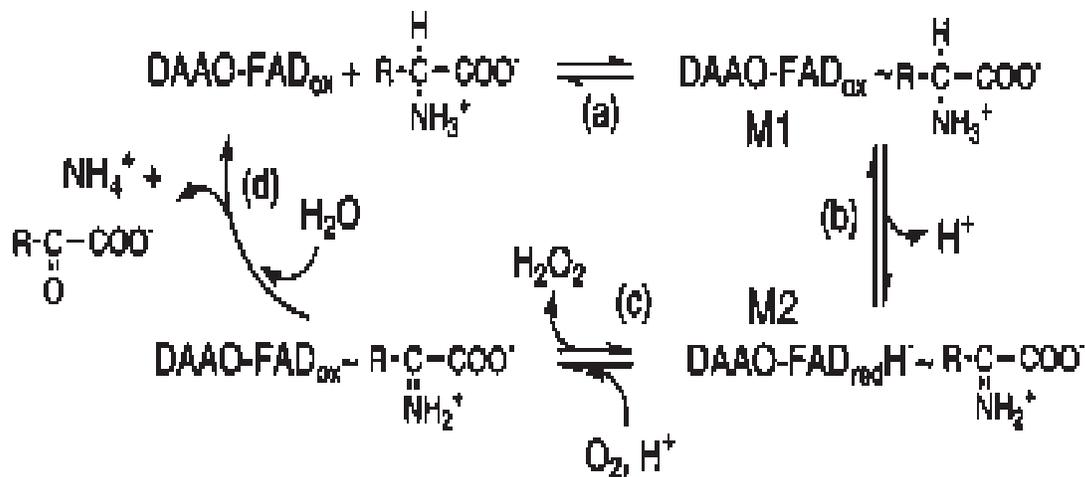


Figura 4. Mecanismo de reacción de la D-aminoácido oxidasa

2.5 AMINOACIDOS.

Los aminoácidos son una importante clase de compuestos orgánicos. Veinte de estos compuestos son los constituyentes de las proteínas. Se les conoce como alfa aminoácidos (α -aminoácidos), pues tienen un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) unidos al mismo átomo de carbono, llamado alfa (α).y son los siguientes: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina,

prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Todos ellos responden a la fórmula general **(Fig. 5)** (5).

2.5.1 PROPIEDADES GENERALES DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son compuestos anfóteros, se pueden comportar, a la vez como ácidos y como bases. A pH 7.0, los aminoácidos sin cadena lateral cargada son zwitteriones, presentan simultáneamente una carga positiva y una negativa **(Fig. 6)**. El punto isoeléctrico es el valor de pH para el cual la carga neta del aminoácido, en solución, es 0. El pK_a de un grupo es el valor de pH al cual la concentración del grupo protonado es igual a la del grupo no protonado. El pK_a del grupo α -carboxilo de los aminoácidos comunes es alrededor de 2 y el del α -amino es cerca de 10. A pH fisiológico, el grupo α -carboxilo de un aminoácido esta cargado negativamente y el grupo α -amino lo esta de manera positiva. Para aminoácidos neutros es el valor medio de los pK_1 y pK_2 **(Tabla 2)**. (50)

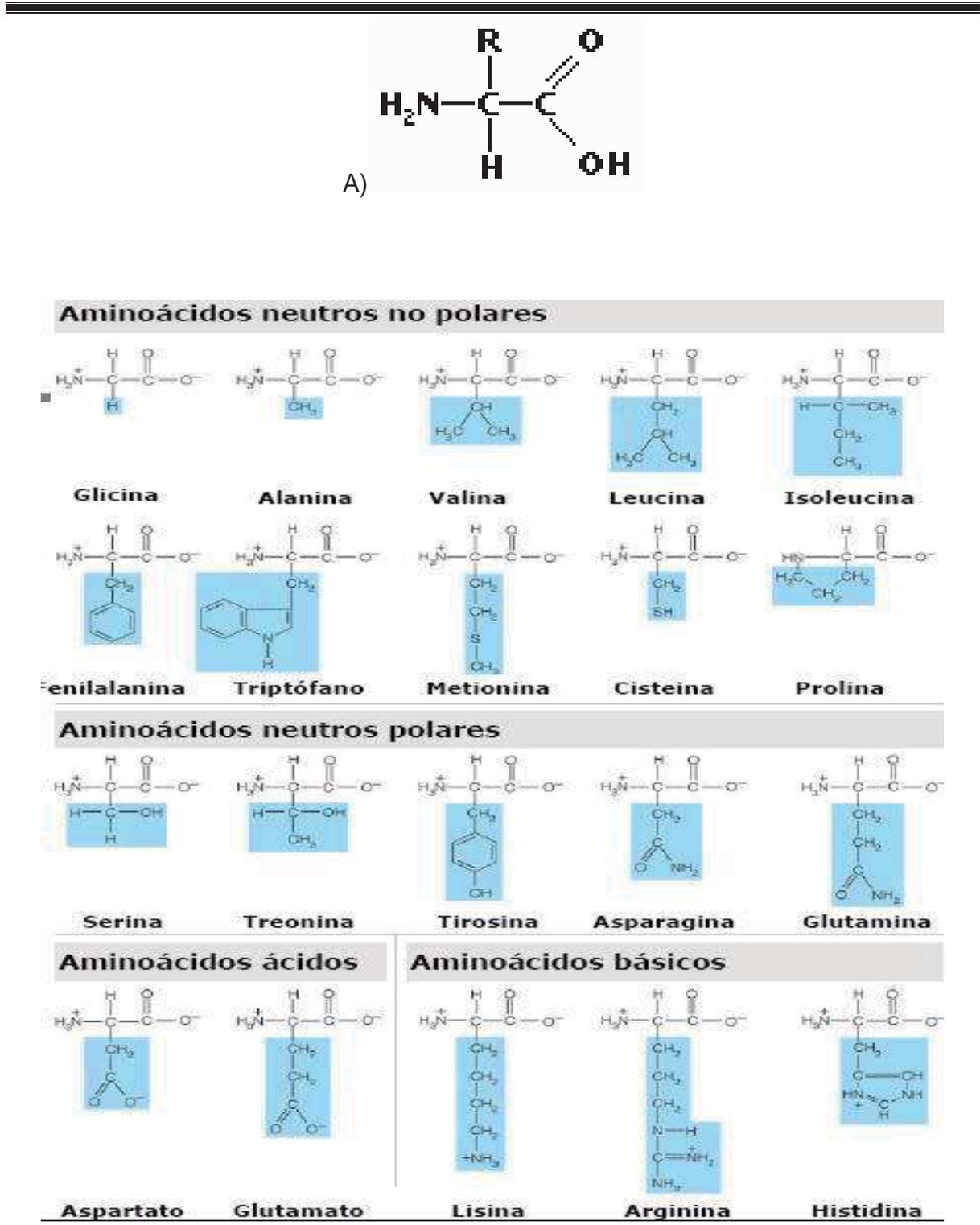


Figura 5. A) Estructura general de los aminoácidos. B) Estructura de los distintos aminoácidos proteicos, organizados de acuerdo a su polaridad. (50)

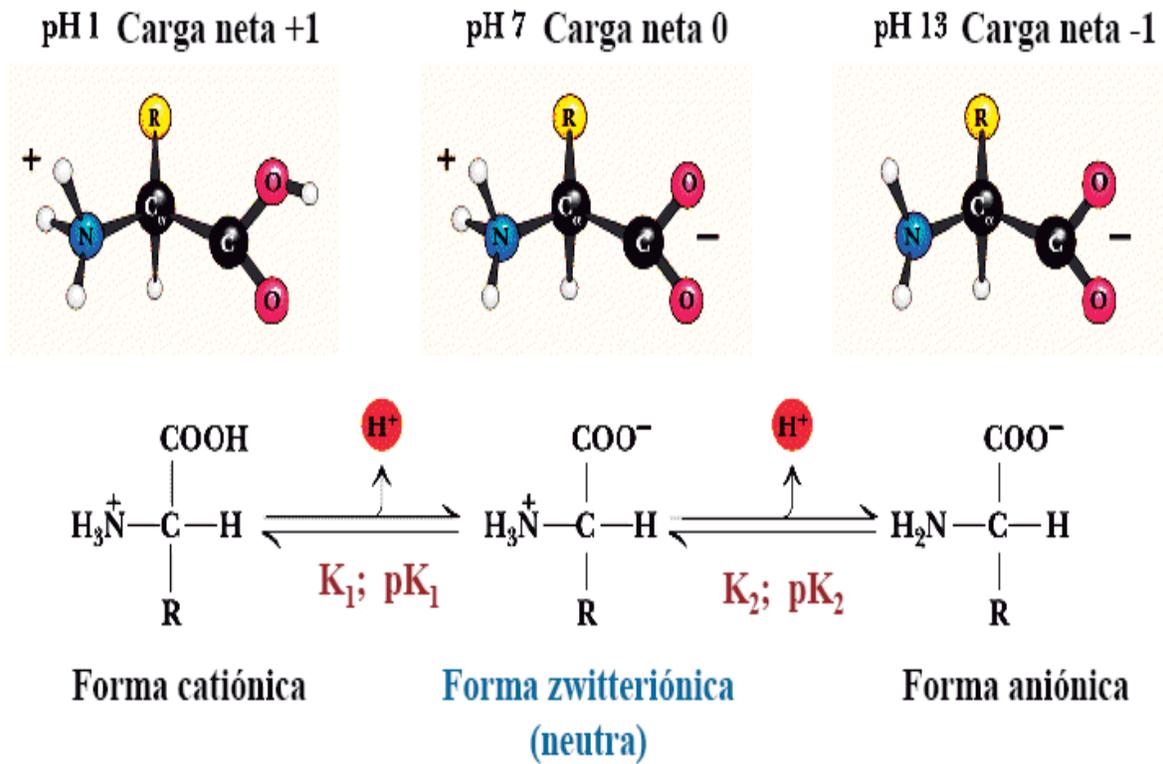


Figura 6. Punto isoelectrico, formación de las formas catiónica, aniónica y zwitteriónica de un aminoácido. (5, 50)

Tabla 2. Pk's de los distintos aminoácidos utilizados durante este trabajo. (50)

Aminoácido	pK ₁	pK ₂
Alanina	2.34	9.69
Serina	2.21	9.15
Metionina	2.28	9.21
Aspartato	2.09	9.82

2.6 D-AMINOACIDOS

Todos los aminoácidos encontrados en las proteínas, excepto la glicina, que no tiene carbono quiral; un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes, los cuales incluyen un grupo carboxilo, uno amino, un hidrógeno y una cadena lateral característica llamada grupo R (48). Debido a esta disposición, los aminoácidos pueden existir en diferentes configuraciones estereoisoméricas, las cuales se distinguen entre si por la orientación espacial de los grupos fijos al carbono alfa o quiral. Por cada carbono asimétrico presente hay dos configuraciones distintas. Los dos estereoisómeros se llaman configuraciones L y D y representan estructuras con imágenes especulares que no se superponen, y que se denominan enantiómeros (5).

Todos los aminoácidos derivados de las proteínas son L-aminoácidos. Pero algunos residuos de estos L-aminoácidos son susceptibles a la racemización, o sea que se convierten a D-aminoácidos debido a procesos que involucran la temperatura y el pH (36).

La racemización de los aminoácidos se debe a la remoción de un protón del enlace asimétrico C-H del carbono alfa del residuo de un aminoácido, dando lugar a la formación de un carbanión como intermediario (**Fig. 7**). Este intermediario tiene una forma triangular, en vez de la forma tetraédrica, que después se vuelve a recombinar con otro protón obtenido del solvente y resultando en la regeneración de la forma tetraédrica. Obteniéndose así una mezcla entre L y D aminoácidos.

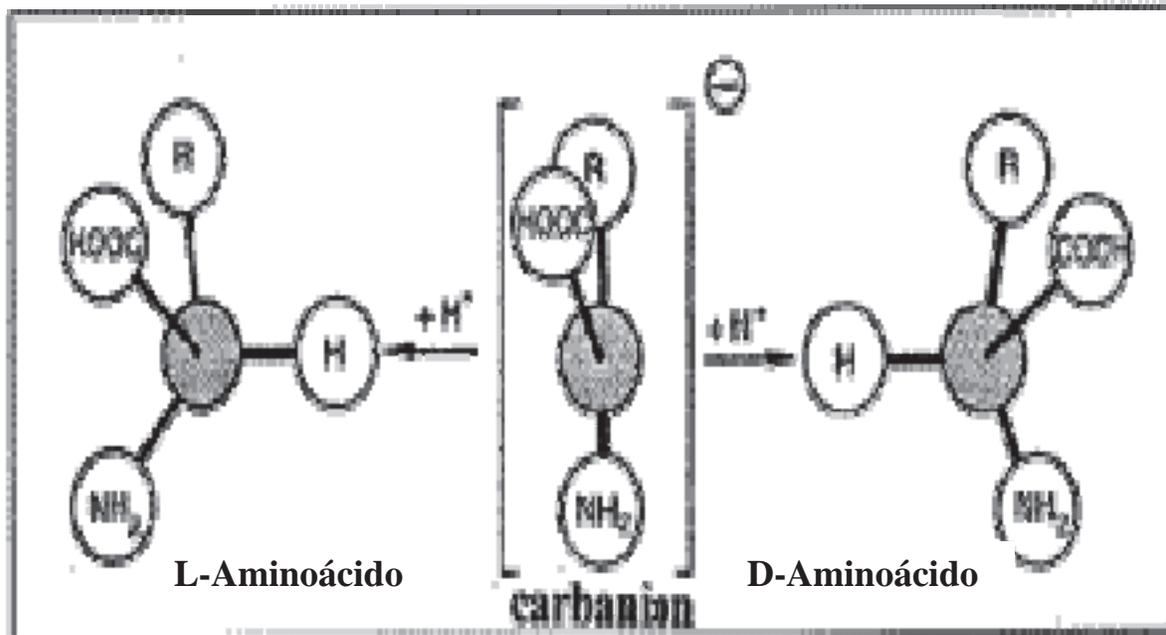


Figura 7. Racemización de los D-aminoácidos catalizada por bases. Tomado y modificado de Friedman (13).

2.7.1 UBICACIÓN DE LOS D-AMINOACIDOS EN LA DIETA

Se ha reportado la presencia de D-aminoácidos en alimentos procesados, encontrándose en productos lácteos como la leche de rumiantes (vaca, cabra y oveja) en la cual se han encontrado D-Ala, D-Asp, D-Glu, D-Lys y D-Ser. Otros productos lácteos con D-aminoácidos son los yogurts, el kefir y la leche cuajada, así como en los quesos Gouda, Emmental y Parmesano en los cuales existen D-Ala, D-Glu, D-Val, D-Leu, D-Ile y D-Ser.

En vegetales como las manzanas, uvas, naranjas, coliflor, zanahorias, ajo y tomates, sus jugos pueden contener D-Ala, D-Arg, D-Asp y D-Glu y pueden servir como indicadores de la actividad bacteriana en estos alimentos.

También se ha encontrado la presencia de D-aminoácidos en alimentos como los huevos, la miel, la harina de pescado y en otros alimentos procesados como: cerveza, vinagre, vinos, pan tostado, carne para hamburguesas, jamón, especias líquidas, leche en polvo, pastas y salsas de soya. En estos alimentos la variedad de D-aminoácidos es muy grande. (13)

2.7.2 FUNCIONES DE LOS D-AMINOACIDOS

Los D-aminoácidos tienen diferentes funciones dependiendo del organismo en el que se encuentren.

En las plantas, principalmente en el arroz, los D-aminoácidos son los responsables de la variedad de arroz que se va a formar. El aminoácido de mayor concentración en vegetales es la D-Alanina, el cual se requiere en diversas plantas para la formación de dipéptidos, cuya función específica no se conoce.

La pared de las células bacterianas está formada por peptidoglucano (azúcar-polímeros de aminoácidos) y ácido teicoico (un polímero de poliolfosfato). El peptidoglucano incluye N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico los cuales están ligados con polipéptidos que contienen D-aminoácidos.

La penicilina y otros antibióticos inhiben la transpeptidación de Gli a D-Ala. Así, al eliminar a la D-Alanina se elimina la última etapa del complejo biosintético del peptidoglucano y por lo tanto se produce una menor resistencia a los antibióticos debido a que los peptidoglucanos son los encargados de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

La presencia de D-aminoácidos en invertebrados marinos está en el rango de 0.04 mM a 44 mM y la función de estos es probablemente la de osmoregulación y la de servir como reservorio nutricional.

En los roedores, el D-aminoácido más estudiado es la D-serina ya que funciona como ligando de los receptores de N-metil-D-aspartato, pudiendo pensarse que la función de éste D-aminoácido sea de neurotransmisor. Otro D-aminoácido con

funciones en los roedores es la D-Glutamina que actúa como un agente inmunosupresor. (13).

En los humanos pueden ser utilizados para la determinación de la edad, ya que el D-aspartato se encuentra en los dientes y comienza a racemizar de una manera más rápida al morir. (13)

Otras razones para estudiar los D-aminoácidos es que pudieran estar involucrados en trastornos psiquiátricos como el Alzheimer y la esquizofrenia y daños crónicos al riñón, así como podrían ser usados como tratamientos a ciertos padecimientos como la hipertensión y el cáncer. (13)

2.3 ANTECEDENTES

Aunque los D-aminoácidos se han considerado compuestos raros en animales (7), se han encontrado niveles significativos en diversos organismos y se encuentran en alimentos que ingerimos frecuentemente (38).

Algunos D-aminoácidos son utilizados en lugar de los L-aminoácidos esenciales por los mamíferos (39). Dado que los mamíferos no disponen de una racemasa que catalice la conversión directa de los D-aminoácidos a los correspondientes isómeros L, se cree que esta transformación se realiza en dos pasos, siendo el primero una desaminación oxidativa a 2-oxoácidos por la D-AAO y el segundo una reaminación asimétrica por una transaminasa para formar los L-aminoácidos. De ser cierto lo anterior, los ratones ddY/D-AAO, que carecen de actividad D-AAO no podrían utilizar D-aminoácidos y, de hecho, se demostró que no podían utilizar D-fenilalanina en lugar del isómero L, pero si podían usar el fenilpiruvato (el 2-oxoácido intermediario en la conversión de D-fenilalanina) (26), resultados que apoyan la hipótesis de la conversión en dos pasos e indican que la D-AAO es una enzima indispensable en el metabolismo de los D-aminoácidos. En levaduras se ha demostrado la inducción de D-AAO por D-aminoácidos añadidos al medio (51), inducción inicialmente descrita por Lyle y Jutila (37).

El papel fisiológico de la D-AAO es objeto de debate en la actualidad. Su conservación a lo largo de la evolución indica que esta enzima debe desempeñar una función importante, ya que su presencia en todos los animales superiores contrasta con la rareza de los D-aminoácidos. Su localización en peroxisomas, donde coexiste con otras enzimas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos y con la catalasa (34,55) puede justificarse por ser el peróxido de hidrogeno uno de los productos de las reacciones de las oxidasas pero señala una implicación metabólica (45).

Desde los primeros informes de la detección de actividades de la D- y la L-aminoácido oxidasas por Krebs en diversos microorganismos y tejidos animales (30, 31), se han publicado varias revisiones sobre estas enzimas (3, 40, 42, 58) y se ha detectado su actividad en un número creciente de organismos. La D-AAO está ampliamente distribuida en eucariontes. Su actividad ha sido detectada en peroxisomas de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (25). En los mamíferos está principalmente localizada en peroxisomas de células de los túbulos proximales de riñón (1); en el hígado, en peroxisomas de hepatocitos (43), y en el encéfalo en microperoxisomas de células gliales de Bergman y astrocitos del cerebelo (17). Entre los invertebrados, se ha encontrado en el hepatopáncreas de moluscos (2). También se han purificado las enzimas del alga *Chlorella vulgaris* (44), de los hongos filamentosos *Neurospora crassa* (47) y *Fusarium solani* (21) y de las levaduras *Candida utilis* (59), *Trigonopsis variabilis* (32) y *Rhodotorula gracilis*, cuyas propiedades se han investigado extensamente.

Las investigaciones sobre la función biológica de la D-aminoácido oxidasa han seguido dos líneas fundamentalmente. La primera sostiene que su papel es metabolizar D-aminoácidos, encontrados en el plasma humano, y cuyos niveles en los tejidos se encuentran incrementados en la vejez y en las enfermedades renales (9). De hecho, en ratones mutantes (ddY/D-AAO) que carecen de D-AAO se encuentran niveles incrementados de D-aminoácidos en varios órganos y concretamente de D-alanina y D-metionina en la orina. La D-metioninuria era causada por contener la dieta de estos ratones un suplemento de DL-metionina, pero

desaparece al eliminar este suplemento de la dieta; en el caso de la D-alanina, se pudo demostrar que provenía de las bacterias intestinales y que sus niveles descendían al administrar a los ratones antibióticos que destruyen la microflora intestinal (27, 28, 29, 41). Estas evidencias sugieren un papel fisiológico de la D-AAO en el metabolismo de los D-aminoácidos.

No obstante, la hipótesis de que la D-AAO sea una enzima detoxificante (10,11) se ve debilitada por el hecho de que la mayor parte de los D-aminoácidos no son tóxicos (16) y su administración en elevadas dosis resulta en su excreción en la orina, o bien son parcialmente metabolizados (35,53). El aprovechamiento de los D-aminoácidos, más que su eliminación, podría ser la finalidad de la existencia abundante y ubicua de la D-AAO.

La cantidad de D-serina endógena hallada en el cerebro humano ha llevado al establecimiento de la hipótesis de su papel en la modulación de la neurotransmisión, actuando en algún paso del metabolismo de los neurotransmisores (14).

Los L-aminoácidos de proteínas, que regularmente se ingieren en la dieta, son racemizados por el calor durante la cocción y también en las condiciones alcalinas de procesos de preparación de alimentos. También están presentes en cantidades significativas en alimentos preparados por fermentación microbiana (4).

3 HIPOTESIS

La D-aminoácido oxidasa está presente en las mitocondrias de cerebro y es activa a condiciones fisiológicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la oxidación de los D-aminoácidos en mitocondrias de cerebro de rata.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el comportamiento de la actividad de la D-aminoácido oxidasa, en mitocondrias de cerebro de rata, cambiando las condiciones de reacción:
 - **Tiempo de incubación**
 - **Temperatura**
 - **Concentración del sustrato**
 - **pH**

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS

Todos los reactivos que se utilizaron fueron adquiridos de Sigma Chemical (St. Louis MO. USA).

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Para todos los experimentos se utilizaron ratas macho Wistar de entre 2 y 3 meses de edad proporcionadas por el departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-IPN.

5.3 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

El aislamiento de mitocondrias se realizó de acuerdo al método modificado de Sims (52). Se sacrificaron las ratas por decapitación, se extrajo el cerebro el cual fue colocado dentro de un medio de aislamiento el cual contenía: 70 μ M de sacarosa, 210 μ M de manitol, 1 μ M de EGTA (ácido etilenglicol bis (β -aminoetiléter)-N, N, N', N' tetraacético), 10 μ M de MOPS (ácido 4-morfolino-propanosulfónico) y albúmina al 0.5 % a pH 7.4 y a 4°C. Después, el tejido se fragmentó y se homogenizó. Posteriormente, se centrifugó a 2200 rpm durante 10 minutos, se decanto el sobrenadante y se centrifugo nuevamente a 10350 rpm por 10 minutos, Se desecho

el sobrenadante y el precipitado se resuspendio en percoll al 15 % este se agrego a un gradiente preparado con percoll al 40% y al 23%, este gradiente se centrifugo a 19000 rpm durante 7 minutos, se obtuvieron 3 bandas y se extrajo la 3ra. con una pipeta y se diluyo 1:4 con el medio de aislamiento y se centrifugo a 14000 rpm, se descarto el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendio con una pipeta, se le adicionaron 300 μ l de albúmina (10 mg/ml) y 3000 μ l del medio de aislamiento, se centrifugo a 9000 rpm por 10 minutos y se resuspendio en 2000 μ l de buffer de pirofosfato 7 mM (pH: 8.3). Se determino la proteína por el método modificado de Biuret (52).

5.4 MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA D-AMINOACIDO OXIDASA

Las mitocondrias aisladas se agregaron a una mezcla de reacción que contenía:

0.3 ml	Buffer de pirofosfato 0.133 M (pH 8.3)
0.1 ml	Catalasa 700 IU/ml
0.3 ml	D-aminoácido 0.1 M
0.2 ml	FAD 0.1 mM
0.1 ml	Metanol 70 % (v/v)

La reacción se inicio adicionando 0.1 ml del aislado mitocondrial, la reacción se llevo acabo a 30°C durante 40 minutos y se detuvo la reacción cada 10 minutos. Esto se realizo agregando 1 ml de ácido tricloroacético al 10%. Después se centrifugo a 2500 rpm por 5 minutos, se tomaron 0.5 ml del sobrenadante y a este se le adicionaron 0.5 ml de KOH 5 N y 0.5 ml de Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptol-1, 2, 4 triazol) en HCL 0.5 N. La reacción se llevo acabo a una temperatura controlada por 15 minutos, al terminar este lapso se agregaron 0.5 ml de KIO₄ 0.75% en KOH 0.2 N a la mezcla con agitación vigorosa. La absorbencia fue medida a 550 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 10. La actividad se calculó de acuerdo a la formula $[2.584(D.O.) / \text{Tiempo}] / \text{Concentración de la proteína}$ (49).

5.5 PROCESAMIENTO ESTADISTICO

Los resultados se expresaron como la media +/- estándar de al menos 3 experimentos y los niveles de significancia se determinaron mediante la t de student con el programa SigmaPlot 2000 versión 9.0 (SPSS).

6. RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL TIEMPO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA D-AMINOACIDO OXIDASA MITOCONDRIAL

Para comenzar este proyecto fue necesario determinar si hay oxidación de los D-aminoácidos dentro de la mitocondria, para lo cual se realizó un ensayo preliminar a 10 min de reacción, 30°C y pH neutro. Al observar que sí existía dicha oxidación se prosiguió a aumentar dicho tiempo de reacción y a observar las variaciones a 20, 30 y 40 min.

Para conocer el comportamiento de la D-aminoácido oxidasa en el transcurso del tiempo, se midió la producción del α -cetoácido correspondiente al aminoácido utilizado, a tiempos de 10, 20, 30 y 40 min a 30°C y pH neutro. Para poder medir dicha actividad se adicionó KOH para proteger al grupo carboxilo del α -cetoácido para un posterior ataque con Purpald y posteriormente se adicionó KIO_4 el cual daba un cromógeno amarillo para su medición en el espectro a una longitud de onda de 550 nm. De esta manera se pudo medir de manera indirecta la actividad de la D-aminoácido oxidasa. En la figura 8 se observa la actividad total y específica de la D-aminoácido oxidasa, observándose que el sustrato que provocó una mayor oxidación fue la D-Ala, seguida por D-Asp, D-Ser y D-Met, las cuales mantuvieron una actividad muy similar.

Al observar la actividad específica (Figura 8-A), podemos ver que la mayor actividad para todos los D-aminoácidos es a 10 min de iniciada la reacción y esta actividad va disminuyendo conforme transcurre el tiempo. Mientras que la actividad total es constante para todos los D-aminoácidos observándose pequeñas variaciones en cada uno de los D-aminoácidos.

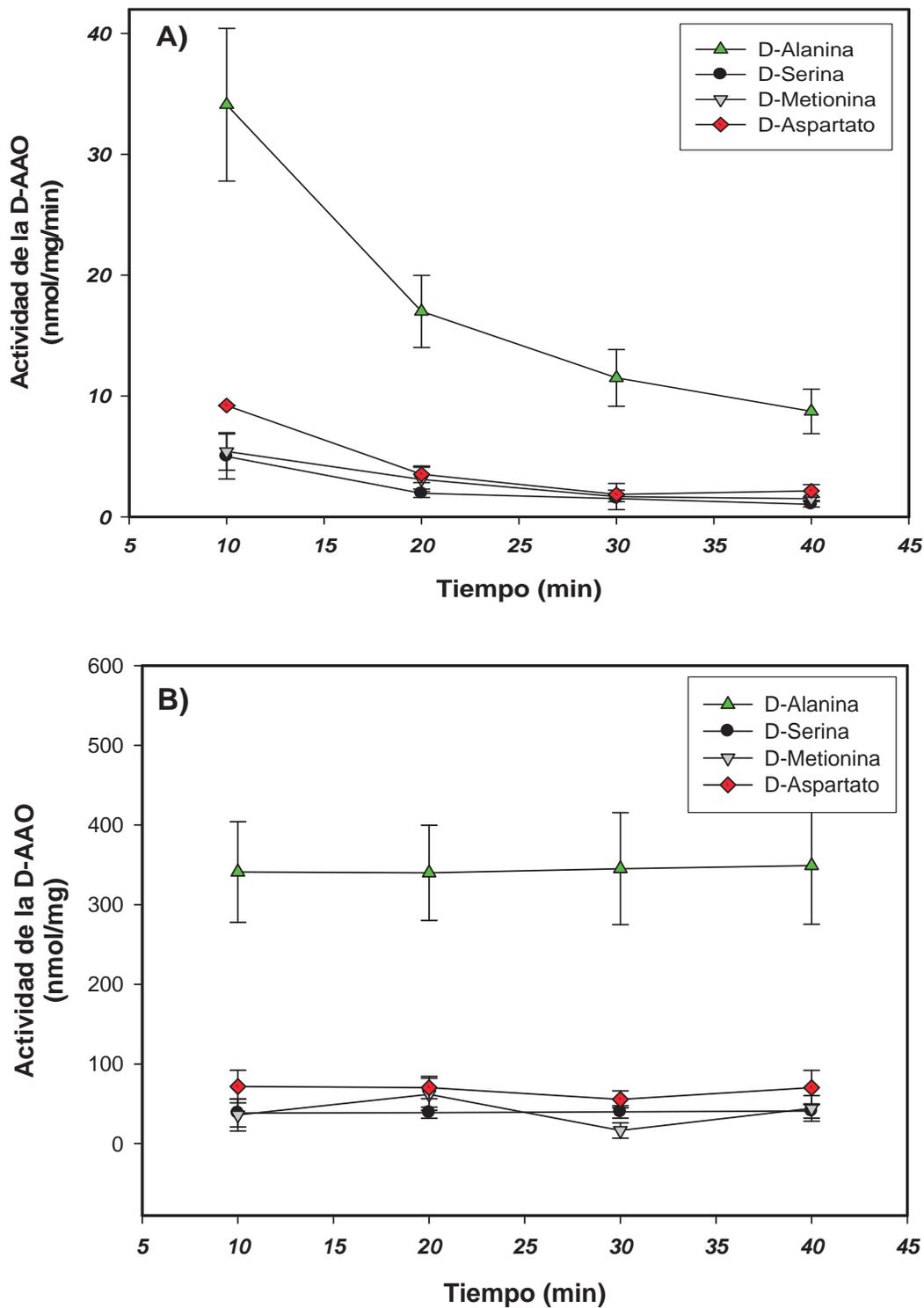


Figura 8. Actividad específica (A) y total (B) de la D-AAO con D-Ala, D-Ser, D-Met y D-Asp a una concentración 0.1 M, a 30°C, a pH 7. (n = 3-4).

6.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA D-AMINOACIDO OXIDASA MITOCONDRIAL

Con base al ensayo anterior solo se trabajó hasta los 10 minutos de iniciada la reacción, en este ensayo se siguió con el mismo procedimiento reportado en la sección de materiales y métodos, cambiando solo la temperatura de reacción a 37°C siendo esta la considerada la temperatura corporal a la que desempeñan casi todas las enzimas su mejor actividad en mamíferos. Este experimento se realizó a 30°C y a 37°C debido a que las mitocondrias son capaces de realizar sus funciones a estas temperaturas.

En la figura 9 se observa el comportamiento de la actividad con todos los sustratos utilizados, viéndose que al cambiar la temperatura a 37°C el sustrato que se ve más afectado es la D-Ala, con una caída en la actividad de la D-AAO. Los demás sustratos también se vieron afectados, ya que también decae la actividad de la D-AAO pero de una manera menos drástica que la D-Ala.

Las actividades que se obtuvieron fueron las siguientes: con D-Ala a 30°C fue de 39.3 nmoles/mg/min y a 37°C fue de 1.70 nmoles/mg/min. Con D-Ser las actividades fueron 4.99 nmoles/mg/min y 2.82 nmoles/mg/min a 30°C y 37°C respectivamente. Las lecturas observadas con D-Met fueron a 30°C de 5.41 nmoles/mg/min y a 37°C de 3.12 nmoles/mg/min. Por último las lecturas con D-Asp fueron de 9.21 nmoles/mg/min a 30°C y de 3.81 nmoles/mg/min a 37°C.

Estos datos dan a conocer que la D-AAO es una enzima que trabaja mejor a temperaturas inferiores a la corporal, o que su afinidad puede cambiar dependiendo de las condiciones a las cuales se encuentre sometida.

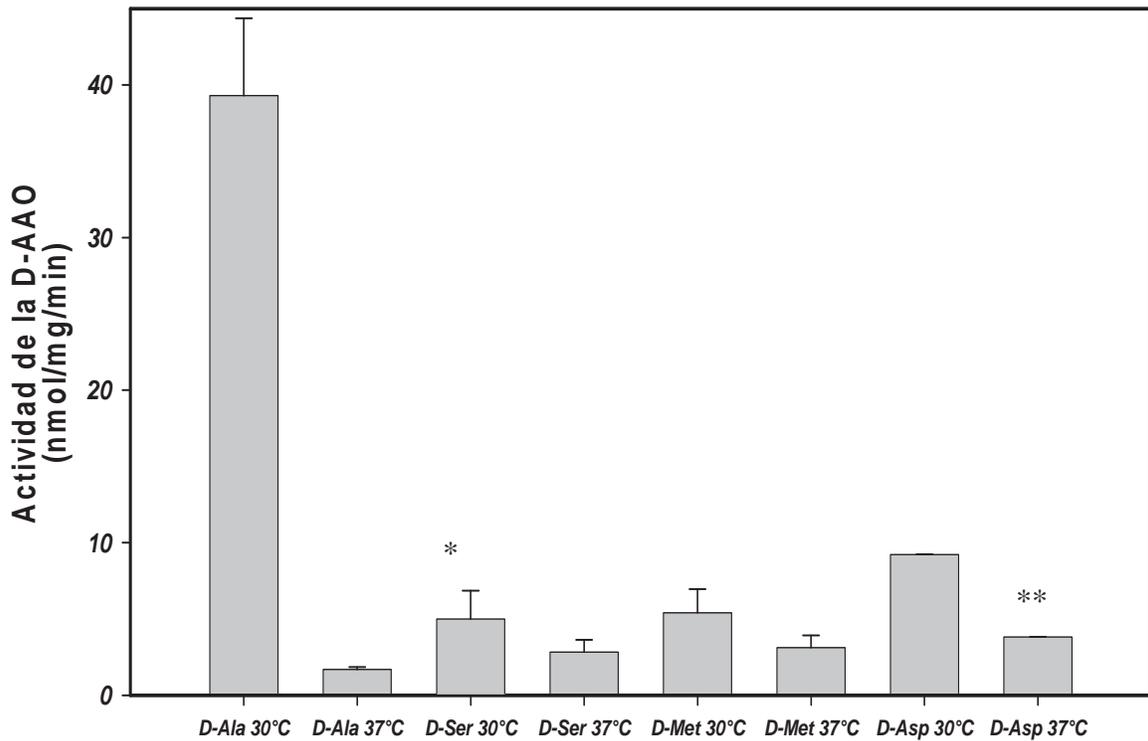


Figura 9. Comparación de la actividad específica de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata, a 30°C y 37°C. A una concentración de 0.1 M, a 10 min. de iniciada la reacción a pH 7. Control 30°C: D-Ala, * $p < 0.005$; Control 37°C: D-Ala, ** $p < 0.0005$. (n=3-4).

6.3 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA D-AMINOACIDO OXIDASA MITOCONDRIAL DE CEREBRO DE RATA

Estos ensayos se realizaron para evaluar la variación en la actividad de la D-AAO, sometida a distintas concentraciones de sustrato.

Para realizar la siguiente serie de experimentos se siguió con el procedimiento mencionado en la sección de materiales y métodos. La única diferencia que fue que la concentración a la cual se preparó el D-aminoácido, fue de 0.05 M, 0.075 M, 0.1 M y 0.2 M. Así se prepararon distintas series para las distintas concentraciones y se realizaron las mediciones correspondientes.

6.3.1 COMPARACION DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD DE LA D-AMINOÁCIDO OXIDASA

6.3.1.1 EFECTO CON D-ALANINA

Al realizar este ensayo se utilizó D-Alanina a concentraciones de 0.05 M, 0.075 M, 0.1 M y 0.2 M, las cuales se incubaron durante 10 minutos y se procedió conforme a lo mencionado en materiales y métodos. En la figura 10 se observa el comportamiento de la actividad de la D-AAO que se obtuvo al agregar el sustrato en las concentraciones mencionadas. Las lecturas de la actividad de la D-AAO variaron, siendo estas a 0.05 M de 4.25 nmoles/mg/min, a la concentración de 0.075 M la lectura registrada fue de 2.85 nmol/mg/min, las lecturas a 0.1 M y a 0.2 M fueron de 34.1 nmol/mg/min y de 2.2 respectivamente. Así, podemos constatar que la mayor actividad se dio al agregar la D-Ala a una concentración de 0.1 M en la cual se da una actividad, aproximadamente, 10 veces superior a la actividad a 0.05 M, siendo esta la mayor actividad después de la de 0.1 M. Sugiriendo que a menor

concentración, se necesita una mayor cantidad de sustrato para saturar a la enzima, llevándola a una posible inactivación.

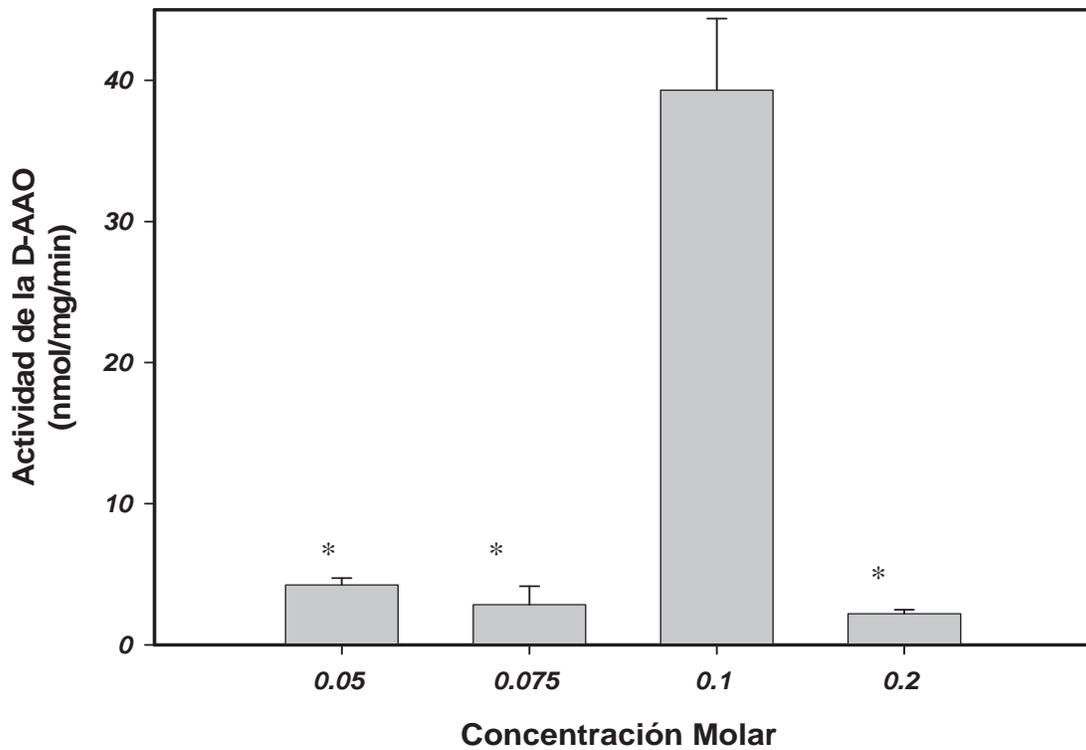


Figura 10. Efecto de la concentración de D-Ala sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata, incubadas durante 10 min a 30°C a un pH de 7. Control 0.1 M, * $p < 0.005$. (n = 4).

6.3.1.2 EFECTO CON D-SERINA

En la figura 11 se observa que con la D-Ser a 0.05 M, la D-AAO no presenta ninguna actividad, denotando que la enzima requiere una mayor cantidad de sustrato para comenzar a presentar una actividad. A las demás concentraciones la D-Ser presenta un comportamiento similar que con D-Ala, dando su máximo de actividad a 0.1 M. Las actividades que se obtuvieron fueron: a 0.075 M fue de 3.1 nmoles/mg/min, a 0.1 M fue de 4.99 nmoles/mg/min y a 0.2 M la lectura fue de 3.63 nmoles/mg/min.

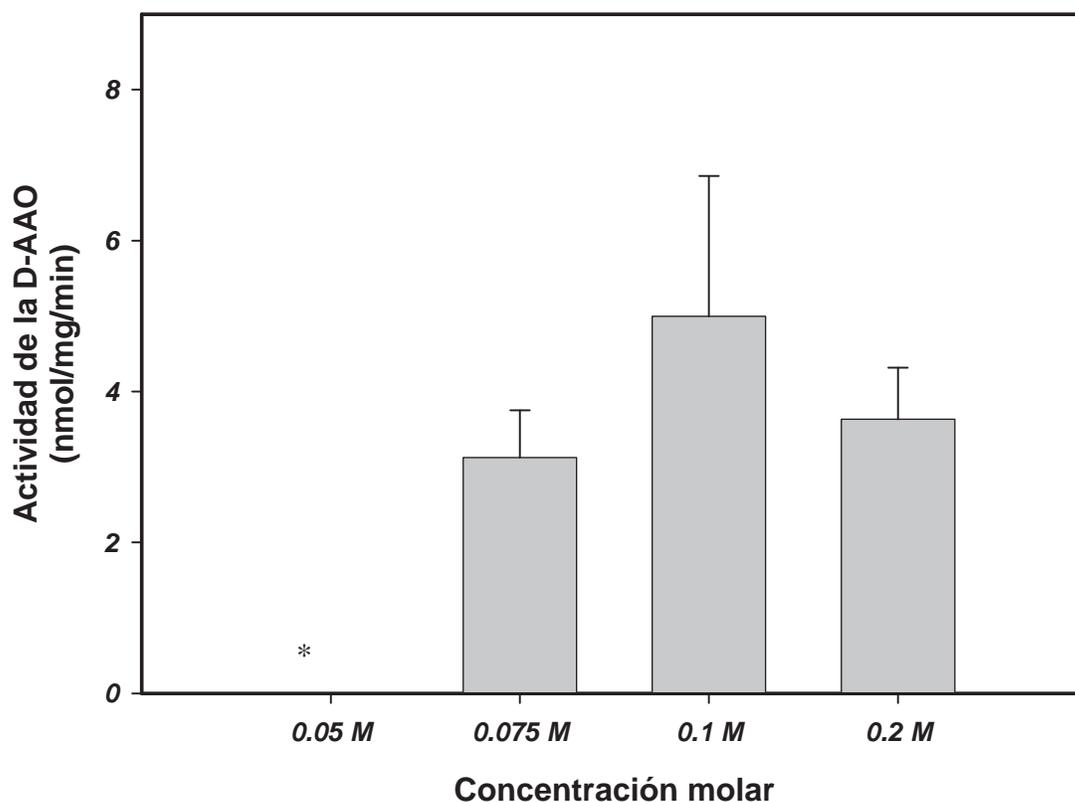


Figura 11. Efecto de la concentración de D-Ser sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata, incubadas durante 10 min a 30°C a un pH de 7. Control 0.1 M, * $p < 0.1$. (n = 4).

6.3.1.3 EFECTO CON LA D-METIONINA

En la figura 12 se observa como este D-aminoácido presenta un comportamiento peculiar dando una actividad elevada a 0.05 M, disminuyendo a 0.075 M y aumentando a concentraciones de 0.1 M y 0.2 M, siendo esta última la concentración a la que hubo mayor actividad. La actividad presentada a 0.05 M fue de 5 nmol/mg/min, después la actividad de 0.075 M disminuyo a 2.5 nmol/mg/min, volviendo a incrementar hasta 5.41 nmoles/mg/min a 0.1 M y de nueva cuenta incrementándose hasta 6.4 nmoles/mg/min

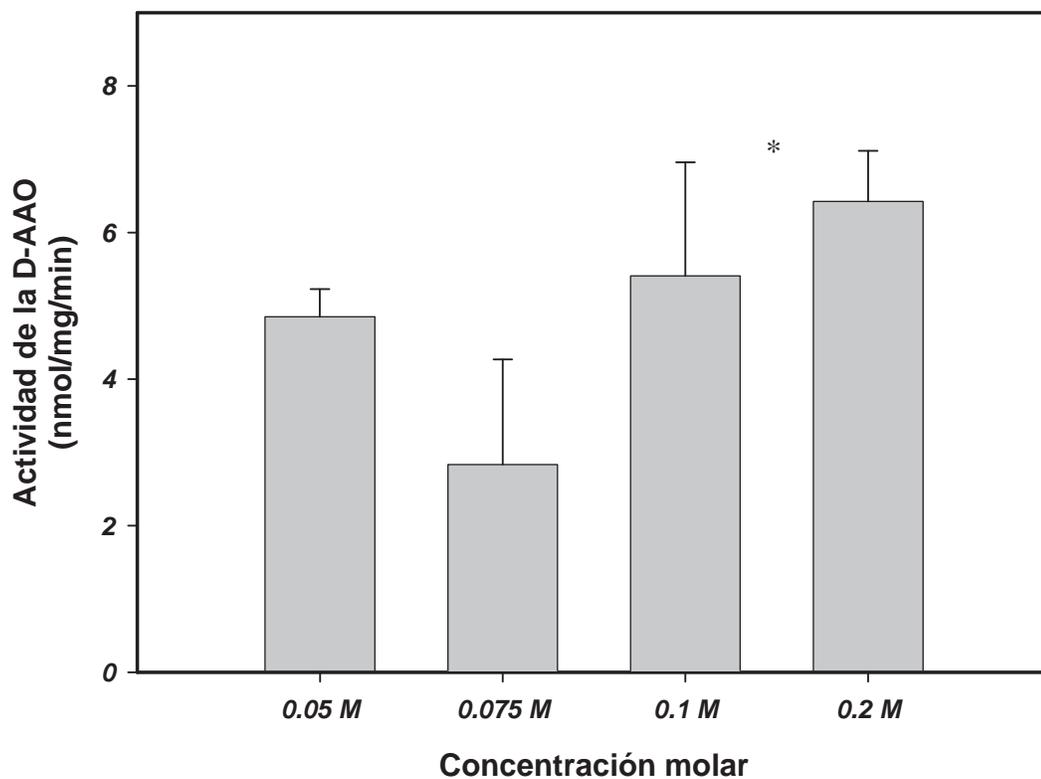


Figura 12. Efecto de la concentración de D-Met sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata, incubadas durante 10 min a 30°C a un pH de 7. Control 0.1 M, * $p < 0.1$. (n = 3-4).

6.3.1.4 EFECTO CON D-ASPARTATO

En la figura 13 se observa el comportamiento de la actividad de la D-AAO con D-Asp. Observando que el comportamiento es muy similar al presentado con la D-Ala. Con un máximo de actividad a una concentración de 0.1 M. Las actividades obtenidas fueron: a 0.05 M de 1.7 nmoles/mg/min, a 0.075 M de 2.7 nmoles/mg/min, a 0.1 M de 9.21 nmoles/mg/min y de 3.92 nmoles/mg/min. Así, constatamos que el comportamiento con todos los sustratos es muy parecido y viendo que la mayor actividad se da a 0.1 M.

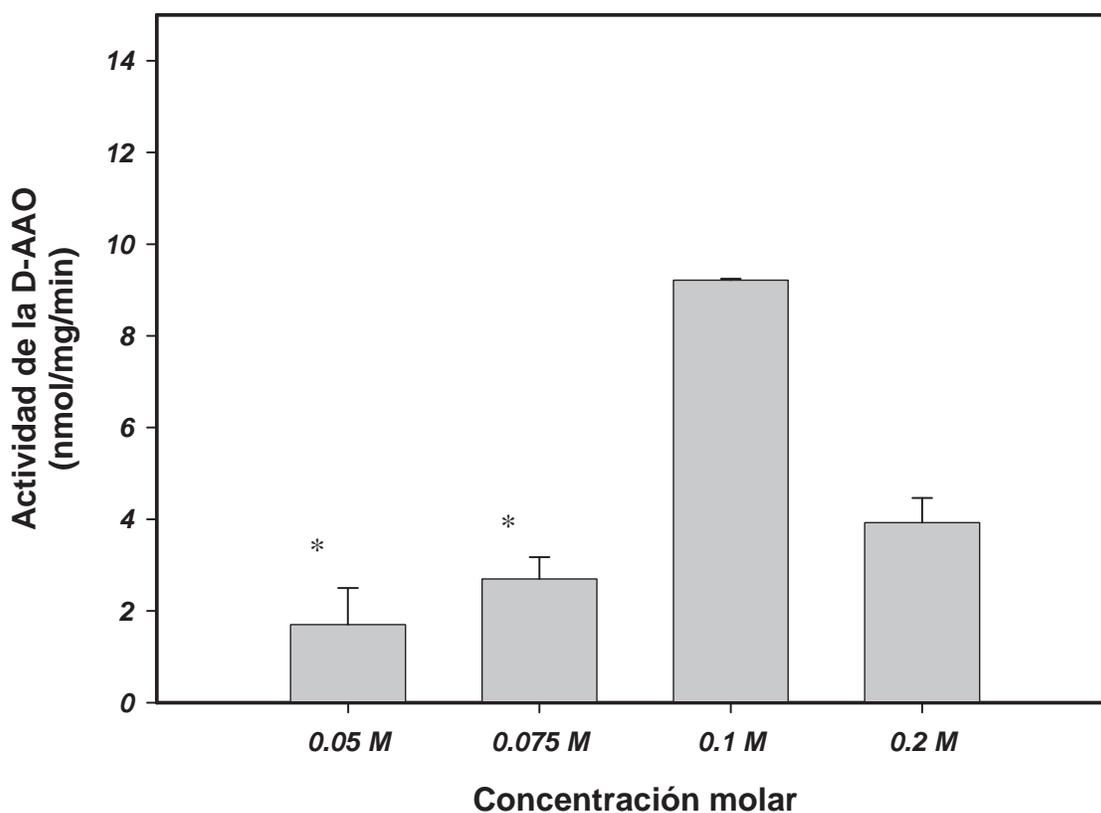


Figura 13. Efecto de la concentración de D-Asp sobre la actividad de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata, incubadas durante 10 min a 30°C a un pH de 7. Control 0.1 M, * $p \leq 0.0001$. (n=3-4).

6.4 EFECTO DEL pH SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA D-AMINOACIDO OXIDASA MITOCONDRIAL

La siguiente serie de ensayos se realizo para observar el comportamiento de la actividad de la D-AAO a distintos valores de pH.

Para estos ensayos se realizó el mismo procedimiento que el mencionado en la sección de materiales y métodos. La variación fue el pH del medio de Pirofosfato 0.133 M, el cual normalmente se utilizó a un pH de 8.3. Ahora se preparó el medio a un pH de 5.3 para el pH ácido y a un pH de 13.3 para el pH básico. Siendo esto constante para todos los sustratos, aunque el pH del medio de reacción fue distinto entre todos los D-aminoácidos, debido a su naturaleza química.

Los pH utilizados se debieron, a que se quería tener medios completamente distintos al medio de referencia (con pH 8.3) y sabiendo que la mezcla de reacción iba a cambiar el pH al agregarle el D-aminoácido a ensayar, se hicieron los ajustes necesarios para que quedaran en rangos ácidos y básicos.

En la figura 14 podemos observar el comportamiento que presentaron los diversos aminoácidos al cambiarles el pH del medio de reacción, siendo muy variado, observándose que a pH neutro fue donde se presentó la mayor actividad en todos los casos.

En el caso de la D-Ala en la figura 14 (A), podemos observar como su mayor actividad fue en el pH neutro, donde por encima de todos los demás presentó su mayor actividad siendo esta de 34.1 nmol/mg/min, así a pH ácido y básico se observa una gran caída de la actividad llegando a 2.73 nmol/mg/min y 0.89 nmol/mg/min, respectivamente.

En la figura 14 (B) se observa la actividad de la D-Ser donde también la mayor actividad se dio a pH neutro, pero muy por debajo de la actividad de la D-Ala. La máxima actividad que presentó la D-Ser fue de 4.99 nmol/mg/min. A pH ácido la actividad fue de 0.55 nmol/mg/min y a pH básico no se presentó actividad perceptible.

En la figura 14 (C) se observa la actividad de la D-Met dando su mayor actividad, 5.41 nmol/mg/min, a pH neutro, en los casos de ácido y básico se presentaron actividades muy pequeñas, de 0.32 nmol/mg/min en ambos casos.

Por último, en la sección D de la figura 14, se observa la actividad del D-Asp en la cual también la mayor actividad se presentó a pH neutro siendo de 9.21 nmol/mg/min, a pH ácido la actividad fue de 1.63 nmol/mg/min y a pH básico no se presentó actividad.

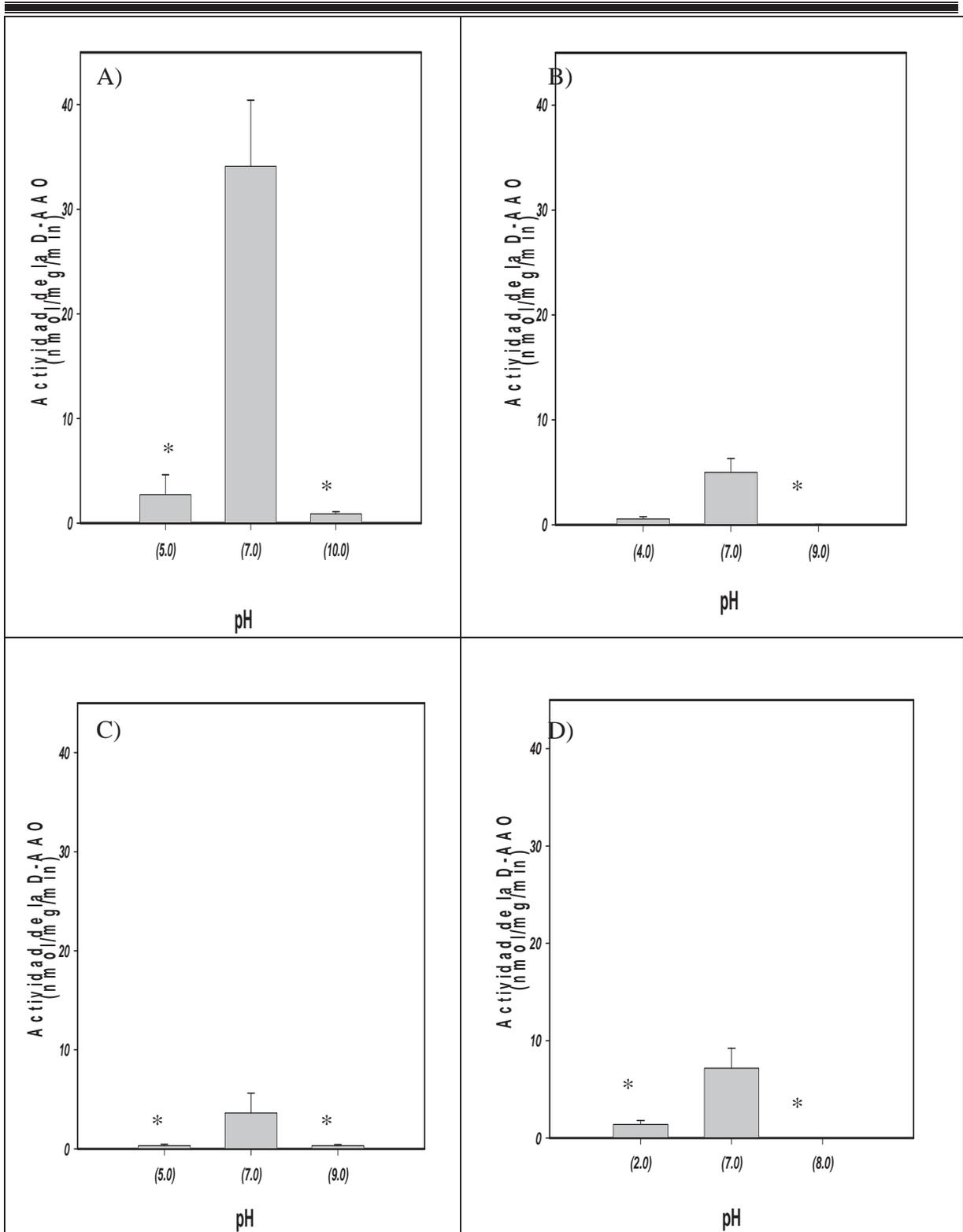


Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad de la D-AAO en presencia de: D-Ala (A), D-Ser (B), D-Met (C) y D-Asp (D) a una concentración de 0.1 M por 10 min. a 30°C. Controles: pH's 7: D-Ala * $p < 0.005$; D-Ser * $p < 0.01$; D-Met * $p \leq 0.1$; D-Asp * $p < 0.05$. (n=3-4)

6.5 CINETICA DE LA D-AMINOACIDO OXIDASA DE MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA

Para hablar en términos de afinidad de la D-AAO, hacia sus distintos sustratos, se realizó un estudio de la cinética con los cuatro D-aminoácidos usados, a una temperatura de 30°C y pH neutro (7.0), cuyos resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de Velocidad máxima de reacción y Km de la D-AAO de mitocondrias de cerebro de rata, con distintos D-aminoácidos.

D-AMINOACIDO	V máx. (μmoles/ml/min)	Km (Moles/l)
D-Alanina	0.249	0.085
D-Serina	0.056	0.068
D-Metionina	0.061	0.04
D-Aspartato	0.08	0.076

De acuerdo a los resultados anteriores y a la figura 15, la D-alanina (D-Ala) es más afín a la D-Aminoácido oxidasa (D-AAO), que los otros D-aminoácidos empleados en este estudio. Según la cinética de la D-AAO esta enzima es homoalostérica dada la gráfica, con tendencia sigmoidea. Acorde a los valores de Vmáx, Km y a la cinética, nos sugieren que esta enzima, la D-AAO, es específica para la D-alanina (D-Ala) e inespecífica para los otros D-aminoácidos que se usaron.

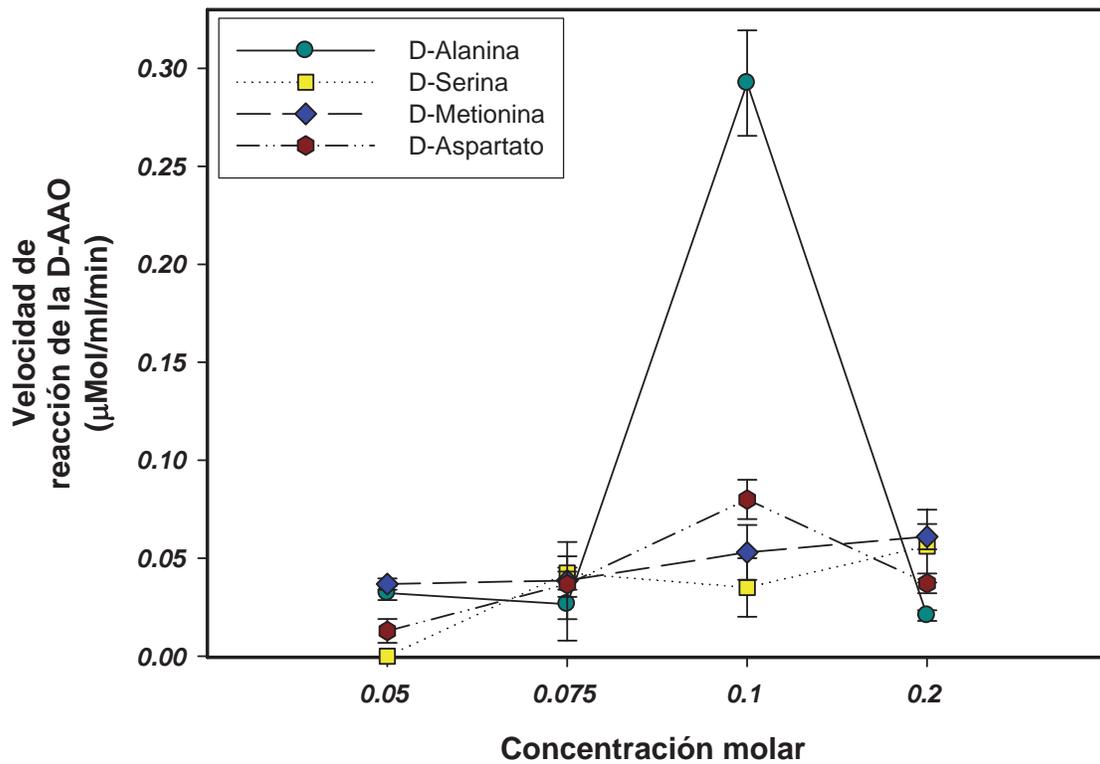


Figura 15. Cinética de la D-AAO en mitocondrias de cerebro de rata, con los distintos sustratos, a 30°C a pH neutro por 10 minutos (n=3-4).

7. DISCUSION

A diferencia de lo sugerido por Katagiri y col. (23), en este trabajo se comprobó la presencia de la D-AAO en las mitocondrias de cerebro de rata. Esto sugiere que la actividad mayoritaria se presenta dentro de la mitocondria y no en el espacio celular (citoplasma).

Al iniciar este proyecto se decidió emplear los D-aminoácidos D-Ala, D-Ser, D-Met y D-Asp debido a que existen varios reportes sobre estos D-aminoácidos (23, 24, 49, 56).

De acuerdo a lo descrito por Kikkoman que llevó a cabo un ensayo en el cual se observan diferentes afinidades que presenta la D-AAO por diferentes sustratos, los resultados arrojaron que el sustrato más afín fue la D-prolina, después la D-metionina, D-fenilalanina, D-alanina, D-valina, D-serina, D-triptofano; L-alanina y glicina no presentaron actividad alguna.

Por lo tanto, se escogieron D-Met, D-Ala, D-Ser y D-Asp conforme a lo descrito por Kikkoman (24) y debido a que existen reportes de que estos tres últimos D-aminoácidos realizan diferentes funciones en distintos organismos, como de D-Asp en sistemas neurosecretores (57); la D-Ser, como regulador de la neurotransmisión de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (23) y D-Ala como componente químico de la pared celular de las bacterias (13).

Como pudimos observar, las actividades fueron muy distintas a las que se esperaban encontrar al utilizar estos sustratos, ya que nuestra mayor actividad se dio con D-Alanina (Fig. 11), en lugar de con la D-Metionina (Fig. 13) que fue una de las

que dieron una actividad mucho menor que todas las demás. Lo anterior pudiera deberse a que los experimentos realizados por Kikkoman (24) se realizaron en *Rhodotorula gracilis*, liofilizada, que es una levadura y no en mitocondrias de cerebro de rata. Por lo cual las características fisiológicas y requerimientos, entre una especie y otra son probablemente la razón de dichas diferencias.

Otro punto fue la temperatura a la que se presentó la mayor actividad, pues se esperaba que ésta se diera a los 37°C, siendo esta la temperatura normal de un cuerpo sin ninguna alteración física. Pero realmente la mayor actividad se presentó a 30°C (fig. 10), donde los cuatro sustratos dieron la máxima de actividad (23, 24, 56). Esta condición sugiere que, tal vez, los D-aminoácidos racemizaron a sus respectivos L-aminoácidos debido a la temperatura a la cual estaban siendo sometidos. Ya que los D-aminoácidos eran agregados antes que la suspensión que contenía las mitocondrias, y por lo tanto estaban expuestos a la temperatura del medio de reacción.

Al realizar la prueba a las diferentes concentraciones, no se tenía ninguna referencia en la cual pudiéramos basar nuestra investigación, lo único que se realizó en este y en todos los demás procedimientos, fue el de preparar los aminoácidos al momento de cada ensayo. (8,15), debido a que todos nuestros D-aminoácidos eran susceptibles de racemizar debido a la temperatura y el pH (36).

En los distintos análisis de pH, como se pudo observar, los aminoácidos variaron mucho la actividad; debido principalmente a la naturaleza química del mismo (50). En el caso de D-Asp no se obtuvo actividad a pH básico, debido a las 2 cargas negativas que el mismo D-aminoácido, en la D-Ser se presentó el mismo efecto que con D-Asp, pudiendo deberse, en este caso, a que la forma aniónica no soportó el pH tan alto. Otra razón por la cual la actividad de la D-AAO se vio disminuida a pH básico y ácido, tal vez porque los D-aminoácidos pudieran haber racemizado; o tal vez se deba a que la D-AAO presente más afinidad a la forma zwitteriónica sobre las formas aniónica y catiónica de los D-aminoácidos.

A diferencia de otro proyecto llevado a cabo en corazón (46) se observa que existen variaciones entre lo observado en cada órgano, esto debido a las características y funciones de cada órgano. Ya que, en algunos ensayos llevados a cabo en mitocondrias de corazón, se presentaron actividades distintas a las observadas en las mitocondrias de cerebro.

8. CONCLUSIONES

- Se encontró la presencia de la D-aminoácido oxidasa dentro de las mitocondrias de cerebro de rata.
- Se observó que para que la D-aminoácido oxidasa mitocondrial trabaje en las mejores condiciones requiere de un pH neutro (7), de una temperatura de 30°C, aunque no sea la corporal y una concentración de sustrato de alrededor de 0.01 M
- La D-Alanina es el aminoácido más afín a la D-AAO ya que en todas las variaciones fue la que presentó la mayor actividad.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Argenmuller, S. (1989). Peroximal oxidase: cytochemical localization and biological relevance, *Prog. Histochem. Cytochem*, 20, 1-65.
2. Blanschko, H. y Hawkins, J. (1952). D-amino acid oxidase in the molluscan liver, *Biochem. J.* 52, 306-312.
3. Bright H.I. y Porter, D.J.T. (1975). Flavoprotein oxidases, en: *The Enzymes* (Boyer, eds) 3rd Edn., pp. 421-505.
4. Brückner, H., Hausch, M. (1989). Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods, *Chromatographia*, 28, 487-492.
5. C. Bohinski R. (1991). *Bioquímica*; Editorial Pearson Educación.
6. C.P. Anthony, G.A. Thibodeau. (1983). *Anatomía y fisiología*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Unidad 3.
7. Corrigan, J.J. (1969). D-amino acids in mammals. *Science*, 164, 142-149.
8. Cortés-Rojo C., Clemente-Guerrero M., Saavedra-Molina A. (2007). Effects of D-amino acids on lipoperoxidation in rat liver and kidney mitochondria. *Amino Acids*. 32, 31-37.
9. Curti, B., Ronchi, S. y Pilone Simonetta, M.P. (1992). D-amino acid oxidase and L-amino acid oxidase, en: *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (Muller, F.eds) pp. 69-94. CRC Press, Boca Raton, Florida.
10. D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L. y Fisher, G.H. (1993a). Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *J. Biol. Chem.* 268, 26941-26949.
11. D'Aniello, A., Vetere, A., Petrucelli, L. (1993b). Further study on the specificity of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase and time course for

-
- complete oxidation of D-amino acids. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*. 105, 731-734.
12. Encarta. (1998). Microsoft Corporation.
 13. Friedman, M. (1999). Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J. Agric. Food. Chem.* 47, 3457-3479.
 14. Fukui, K. (1997). Tissue specific expression of the D-Amino acid oxidase gene, en: Stevenson KJ., Massey V, Williams CH. Jr, Eds *Flavins and flavoproteins 1996*. Proceedings of the 12th international symposium; 1996 June 30-july 6; Calgary (Alberta, Canada). University of Calgary Press, pp 199-202.
 15. González-Hernández J.C., Aguilera-Aguirre, L., Pérez-Vázquez, V., Ramírez J., Clemente-Guerrero, M. Cortés-Rojo C, y Saavedra-Molina, A. (2003). Effect of D-amino acids on some mitochondrial functions in rat liver. *Amino Acids* 24, 163-169.
 16. Harper, A.E., Benevenga, N.J. y Wohlheuter, R.M. (1970). Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50, 428-558.
 17. Horiike, K., Tojo, H., Arai, R., Yamano, T., Nazaki, M. y Maeda, T. (1987). Localization of D-amino acid oxidase in Bergmann glial cells and astrocytes of rat cerebellum, *Brain Res. Bull.* 19, 587-596.
 18. <http://es.wikipedia.org/wiki/Neurotransmisor>.
 19. <http://www.iqb.es/neurologia/a002.htm>.
 20. <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/neurotrans.htm>.
 21. Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Ueda, Y. y Koshaka, M. (1990). Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*, *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 1063-1069.
 22. Kartvelishvily E., Shleper M., Balan L., Dumin E. y Wolosker H. (2006). Neuron-derived D-Serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-Aspartate receptors. *Biological Chemistry*. pp. 14151-14162).
 23. Katagiri M, Tojo H, Horiike K y Yamano T. (1991). Immunochemical relationship of D-AAO in various tissues and animals. Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, Japan.
 24. Kikkoman (2005) Characterization of the RgD-AAO. Kikkoman Company.
-

25. Konno, R. y Yasumura, Y. (1981). Activity and substrate specificity of D-amino acid oxidase in kidneys of various animals. *Zool. Mag. (Tokyo)* 90, 1368-1376.
26. Konno, R. y Yasumura, Y. (1984). Involvement of D-amino acid oxidase in D-amino acids utilization in the mouse. *J. Nutr.* 114, 1617-1621.
27. Konno, R., Isobe, K., Niwa, A., y Yasumura, Y. (1988a). Excessive urinary excretion of methionine in mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity, *Metabolism*, 37, 1139-1142.
28. Konno, R., Nagata, Y., Niwa, A. y Yasumura, Y. (1988b). Lack of D-amino acid oxidase activity causes a specific renal amino aciduria in the mouse, *Biochim. Biophys. Acta* 967, 382-390.
29. Konno, R., Niwa, A. y Yasumura, Y. (1990). Intestinal bacterial origin of D-alanine in urine of mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Biochem. J.* 268, 291-292.
30. Krebs, H.A. (1935). Metabolism of D-amino acids. III. Deamination of D-amino acids. *Biochem. J.* 29, 1620-1632.
31. Krebs, H.A. (1951). Oxidation of amino acids. *Enzymes* 2, 499-505.
32. Kubicek-Pranz, E. M. y Röhr, M. (1985). D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*, *J. Appl. Biochem.* 7, 104-113.
33. Laguna J. (1978). *Bioquímica*, Editorial Fournier.
34. Lazarow, P. B. y de Duve, C. (1976). A fatty acyl CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes enhancement by clofibrate, a hipolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2043-2046.
35. Lehmann, W. D., Theobald, N., Fischer, R. y Heinrich, H. C. (1983). Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hidroxilation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L-and D-phenylalanine. *Clin. Chim. Acta*, 128, 181-198.
36. Loewy G. Ariel. Siekevitz Philip. (1974). *Estructura y función celular*; Editorial C.E.C.S.A.
37. Lyle, L.R. y Jutila, J.W. (1968). D-amino acid oxidase induction in the kidneys of germ-free mice. *J. Bacteriol.* 96, 606-608.
38. Man, .E.H. y Bada, J.L. (1987). Dietary D-amino acids. *Rev. Nutr.* 7 209-225.

39. Meister, A. (1965). Biochemistry of D-amino acids. Anonymous 2nd edn., pp 220-224, 297-304. Academic Press New York.
40. Meister, A. y Wellner, D. (1963). Flavoprotein amino acid oxidases. *Enzymes*, 7, 609-617.
41. Nagata, Y., Konno, R., Yasumura, Y. y Akino, T. (1989). Involvement of D-amino acid oxidase in elimination of free D-amino acids in mice. *Biochem, J.* 257, 291-292.
42. Neims, A. H. y Hellerman, L. (1970). Flavoenzymes catalysis, *Annu. Rev. Biochem.* 39, 867-888.
43. Perotti, M. E., Gavazzi, E., Trussardo, L., Margaretti, N. y Curti, B. (1987). Immunoelectron microscopic localization of D-amino acid oxidase in rat kidney and liver. *Histochem. J.* 19, 157-169.
44. Pistorius, E. K. y Voss, H. (1977). A D-amino acid oxidase from *Chlorella vulgaris*. *Biochem. Biophys. Acta* 481, 395-406.
45. Ramón Olayo, F.A. (1999). Purificación y caracterización de D-AAO de *Rhodotorula Gracilis*. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid, España 1999.
46. Rangel H.P. (2007). Determinación de la actividad de la D-aminoácido oxidasa en mitocondrias de corazón de rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH. Morelia, Mich., México.
47. Rosenfeld, M. G. y Leiter, E. H. (1977). Isolation and characterization of mitochondrial D-amino acid oxidase from *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.* 55, 66-74.
48. Roskoski Robert Jr. (1998). Bioquímica; Editorial McGraw-Hill Interamericana.
49. Ryuichi Konno. (1998). Departamento of Microbiology. Dokkyo University School of Medicine, Miao, Biological Procedures Online, Vol. 1, No. 1, May 14, 1998, 27-31.
50. Salgado J. (2005-06). Estructura, Propiedades y Funciones de los Aminoácidos y las Proteínas. UVEG.

-
51. Simonetta, M. P., Verga, R., Fretta, A. y Hanzotet, G. M. (1989). Induction of D-amino acid oxidase by D-alanine in *Rhodotorula gracilis* grown in defined medium. J. Gen. Microbiol. 135, 593-600.
 52. Sims. N.R. (1990). Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. J. Neurochem. 55, 698-707.
 53. Stegink, L.D., Moss, J., Printen, K.J. y Cho, E.S. (1980). D-methionine utilization in adults monkeys fed diets containing DL-methionine. J. Nutr. 110, 1240-1246.
 54. Umhau S, Pollegioni L, Molla G, Diederichs K, Welte W, S. Pilone y Ghisla, S. (2000). The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of Flavin-dependent substrate dehydrogenation. Biochemistry. 23, 12463-12468.
 55. Usuda, N., Yokota, S., Ichikawa, R., Hashimoto, T. y Nagata, T. (1991). Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes, J. Histochem. Cytochem. 39, 95-102.
 56. Wang H, Wolosker H, Morris J.F, Pevsner J, Snyder S.H, and Selkoe D.J. (2001). Naturally occurring free D-Aspartate is a nuclear component of cells in the mammalian hypothalamo-neurohypophyseal system. Neuroscience. Lett. 109, 1-4
 57. Wang H, Wolosker H, Morris J.F, Pevsner J, y Snyder S.H. (2000). Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-Aspartate: evidence for biological roles of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. J. Endocrinol. 167, 247-252.
 58. Yagi, K. (1971). Reaction mechanisms of D-amino acid oxidase, Adv. Enzymol. 34, 41-78.
 59. Zwart, A. B., Overmars, E. H. y Harder, H. (1983). The role of peroxisomes in the metabolism of D-alanine in the yeast *Candida utilis*, FEMS. Microbiol. Lett. 19, 225-230.
-