

PÉPTIDOS Y PEPTIDOMIMÉTICOS CON ACTIVIDAD ANTICOLINESTERÁSICA

Sanchis, Iván

Laboratorio de Péptidos Bioactivos – Departamento de Química Orgánica – Facultad de Bioquímica y
Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral

Área: Ciencias biológicas

Sub-Área: Bioquímica

Grupo: Y – Becario BIT

Palabras clave: ALZHEIMER, INHIBIDORES, PÉPTIDOS

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y afecta globalmente a 47,5 millones de personas. La OMS la reconoce como una prioridad en salud pública. Patológicamente, se caracteriza por la formación de filamentos y placas seniles en el cerebro, cuyo componente principal es el péptido beta-amiloide (A β), que deriva de la proteólisis de la proteína precursora amiloidea (APP) (Carvajal y Inestrosa, 2011). Sin embargo, según la denominada “hipótesis colinérgica”, la pérdida de las funciones cognitivas en la EA se debe a una exacerbada actividad de las enzimas colinesterasas (acetilcolinesterasa o AChE y butirilcolinesterasa o BChE), que catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en colina y ácido acético, causando un descenso de los niveles fisiológicos de ACh (Carvajal y Inestrosa, 2011). Por este motivo, la mayoría de las drogas disponibles y en desarrollo para el tratamiento de la EA buscan inhibir la actividad de la AChE o BChE, para retrasar la inactivación de la ACh después de su liberación y favorecer su actividad estimuladora del sistema nervioso (Metah y col., 2012). De particular interés resultan, en este sentido, los inhibidores llamados duales, capaces de inhibir ambas enzimas (Metah y col., 2012). Además, se conoce que las colinesterasas poseen dos sitios de unión: el sitio activo (CAS) responsable de la catálisis y el sitio aniónico periférico (PAS). Se ha descrito exhaustivamente cómo el sitio PAS de la AChE, por un lado, participa directamente de la catálisis, y por el otro, es mediador de la reacción de agregación del péptido A β , proceso en el cual esta enzima actúa como chaperona. Estas propiedades convierten a este sitio en un blanco molecular de gran interés para el tratamiento de la EA (Carvajal y Inestrosa, 2011).

Algunos péptidos con capacidad anticolinesterásica se hallaron en venenos de animales de especies poco relacionadas, como las fasciculinas I y II (FAS), inhibidores duales del sitio PAS obtenidas de *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde), y el péptido Hp-1971, aislado de la piel de *Hysiboas pulchellus* (rana del zarzal) (Siano y col., 2014).

OBJETIVOS

- Diseñar, sintetizar y evaluar nuevos péptidos y peptidomiméticos inhibidores de AChE y BChE tomando como modelo el péptido Hp-1971.

- Analizar el mecanismo inhibitorio de los péptidos mediante ensayos enzimáticos cinéticos y estudios de *docking* flexible.
- Evaluar la citotoxicidad de los péptidos sintetizados.

METODOLOGÍA

Síntesis en fase sólida de los péptidos (SPPS) con química Fmoc

Se sintetizaron como amida C-terminal usando una resina H-Rink Amida Chem Matrix. La desprotección del Fmoc se realizó con piperidina 20% en DMF, los acoplamiento con TBTU, HOBt y DIEA en DMF y el clivaje final con una mezcla TFA/H₂O/TIS (95: 2,5: 2,5). Cada ciclo se evaluó cualitativamente con reacción de ninhidrina. Se sintetizaron análogos de las regiones 8-15 (Serie B) y 7-21 (Serie A) del Hp-1971, que mostraron tener capacidad inhibitoria (Siano y col., 2014), sus secuencias se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Secuencias sintetizadas y originales. En rojo, las diferencias aminoacídicas.

Serie B	Secuencia	Serie A	Secuencia
BF-G	LPLGAGP F -NH ₂	AF-G	GLPLGAGP F AGPGKR-NH ₂
BF-S	LPLGAS P F-NH ₂	AF-S	GLPLGAS P FAGPGKR-NH ₂
BW-G	LPLGAGP W -NH ₂	AW-G	GLPLGAGP W AGPGKR-NH ₂
BW-S	LPLGAS P W-NH ₂	AW-S	GLPLGAS P WAGPGKR-NH ₂
BY-G	LPLGAGP Y -NH ₂	AY-G	GLPLGAGP Y AGPGKR-NH ₂
BL-G	LPLGAGP L -NH ₂	AL-G	GLPLGAGP L AGPGKR-NH ₂
BS-G	LPLGAGP S -NH ₂	AS-G	GLPLGAGP S AGPGKR-NH ₂
BS-S	LPLGAS P S-NH ₂	AS-S	GLPLGAS P SAGPGKR-NH ₂
BA-S	LPLGAS P A-NH ₂	AP-S	GLPLGAS P AAGPGKR-NH ₂
BPOH-G	LPLGAGP P-OH A-NH ₂	APOH-G	GLPLGAGP P-OH AAGPGKR-NH ₂
8-15	LPLGAGPA-NH ₂	7-21	GLPLGAGPAAGPGKR-NH ₂

Ensayo de punto final de actividad inhibitoria de BChE y AChE

Ambos ensayos se basaron en la técnica de Ellman (Ellman y col., 1961), que consiste en la hidrólisis de butirilcolina/acetilcolina que genera butirato/acetato y colina que, en presencia de DTNB, produce una reacción de color (lectura a 405 nm). La BChE se ensayó mediante un kit enzimático para determinación de colinesterasa Wiener lab, a partir de suero humano y siguiendo el protocolo del fabricante. Para la AChE, se utilizó un micrométodo en el cual 0,25 U/mL de AChE comercial tipo VI-S de *Electrophorus electricus* (EEAChE) se incubaron por 30min con 0,24mM de yoduro de ACh, 0,2 mM de DTNB, 0,04 mM de Na₂PO₄ y los péptidos, a pH 7,5 y transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 405 nm. Para ambas enzimas las concentraciones finales de péptidos ensayadas fueron 50, 100 y 200 µM, los ensayos se realizaron por duplicado frente a blancos de enzima y de muestra y como control positivo se utilizó galantamina.

Evaluación de la citotoxicidad - Ensayo de lisis de eritrocitos (hemólisis)

Se ensayó la actividad lítica sobre glóbulos rojos humanos (GRh). Se incubaron 50, 100,

200 y 400 μM de péptido en 0,4% (v/v) de GRh en solución fisiológica en tubos Eppendorf (1h, 37°C) y se centrifugaron (1000xg, 5min). Alícuotas de sobrenadante se transfirieron en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 405nm. El 0 y 100% de hemólisis se determinó en solución fisiológica y 1% de Triton-X100 respectivamente. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Ensayo cinético de la inhibición del Hp-1971 de la enzima acetilcolinesterasa

El ensayo se basó en la técnica de Ellman (Ellman y col., 1961). Se utilizó la EEChE a 0,25 U/mL finales. Como sustrato se utilizó yoduro de ACh a 0,96-0,03 mM con 0,2 mM de DTNB, Na_2PO_4 0,04 mM y con 0 (basal) y 100 μM de Hp-1971. El pH fue 7,5. La enzima se incubó con el inhibidor por 30min y se comenzó la lectura al adicionar el sustrato. Se midió la absorbancia a 405nm durante 2,28 minutos cada 2 segundos (75 lecturas). Se ensayó por triplicado. Los resultados se estudiaron mediante ajuste no lineal con las ecuaciones de Michaelis-Menten. Las variaciones de V_m y K_m con y sin inhibidor, para determinar el tipo de inhibición, se compararon con un test de varianza para un factor y se consideró estadísticamente significativo un $p < 0,05$.

Estudios de *docking* flexible de la AChE

Se utilizó un modelo de AChE obtenido del Protein Data Bank (PDB IE66) de *Torpedo californica* (tcAChE), de alta homología con la EEChE y en la cual se determinaron los residuos de los sitios CAS y PAS. Se le removió el ligando, las moléculas de agua y se le adicionaron hidrógenos polares. Los cálculos se realizaron con el programa HADDOCK con sus parámetros por defecto. Como residuos activos de AChE se seleccionaron los 3 aminoácidos del sitio CAS y los 5 del sitio PAS (200, 440, 327 y 70, 72, 121, 279, 334, respectivamente). Los resultados se analizaron con el programa Discovery Studio Visualizer, que se utilizó también para preparar el modelo de tcAChE. El modelado molecular del péptido se realizó con PEPFOLD3. Todos sus 21 residuos se seleccionaron como activos para el *docking*.

RESULTADOS

Inhibición a punto final de AChE, BChE y hemólisis

Algunos de los péptidos evidenciaron porcentajes de inhibición mayores que los de las secuencias originales 8-15 y 7-21 (para BChE, 15 y 48% respectivamente y para AChE, 16 y 24% respectivamente, a 200 μM). El péptido BS-G inhibió la BChE un 58% más que el original y el AW-S un 50% más. Con respecto a la AChE, los porcentajes fueron en menores; los que mayor inhibición presentaron fueron los péptidos denominados: BA-S (25,4% a 200 μM) y AF-G (18,5% a 200 μM). Los más hemolíticos fueron: BW-G y BL-G (hemólisis de 62,55% y 56,61% a 400 μM) para la serie B y AF-G y AW-G para la serie A (100% de hemólisis a 400 μM).

Estudio del tipo de inhibición mediante ensayo cinético y *docking*

Los resultados del ensayo cinético se muestran en la **Figura 1**. Se observa que la curva sigue el esquema de un inhibidor de tipo no competitivo. Además, se observa una variación estadísticamente significativa de la V_m y no de la K_m (ver resultados del test de varianza en **Figura 2**). Este resultado concuerda con el *docking*, donde el péptido interacciona con la región PAS de la enzima y no con el sitio activo. El programa encontró 8 arreglos (*clusters*) y en la **Figura 2** se muestra una representación del que

tuvo el mejor puntaje HADDOCK (-102.1+/- -2.7). Con esta disposición, el inhibidor mostró interacción con 11 residuos: tyr70, val71, glu73, gln 74, phe 75, asp 276, trp 279, asp 285, leu 333, tyr 334, phe 339 (los residuos tyr70, trp 279 y tyr 334 son tres de los cinco que componen el sitio PAS), la mayor parte de las interacciones fueron de tipo hidrofóbico.

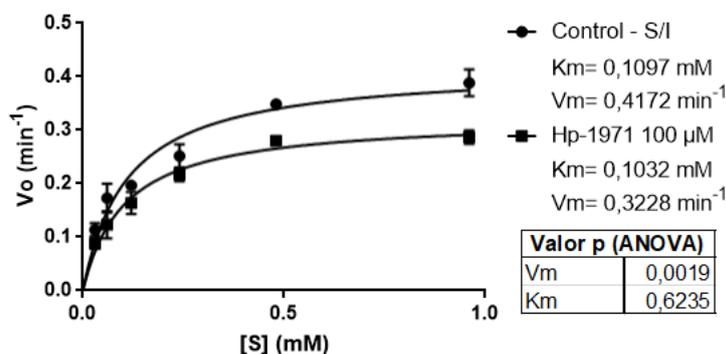


Figura 1: Evaluación de la variación de velocidad inicial de reacción (V_o) según concentración de sustrato (S) de la AChE en estado basal y en presencia de $100\mu\text{M}$ de Hp-1971. Los puntos muestran el promedio de las tres mediciones realizadas. Se reporta también el valor p obtenido con el análisis de varianza (ANOVA) para un factor.

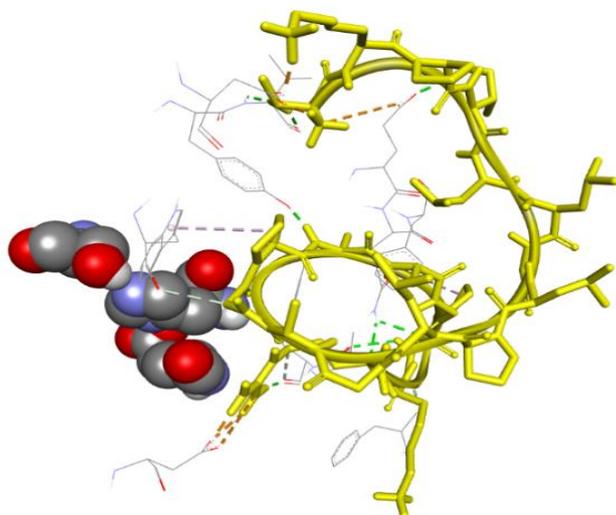


Figura 2: *Docking* del péptido Hp-1971 con tAChE. En amarillo, el péptido; con líneas continuas, los residuos de la enzima en los que se encontró interacción; con líneas discontinuas las interacciones y con burbujas los 3 aminoácidos del sitio activo.

CONCLUSIONES

La gran variedad de análogos generados permitió hallar modificaciones que mejoran la capacidad inhibitoria de la secuencia original. El análisis conjunto de los resultados del estudio cinético y los cálculos de *docking*, a su vez, permitió deducir que la inhibición se produce a través de una interacción con el sitio aniónico periférico de la enzima. Esto resulta de gran interés como diana terapéutica dada su participación en diversos procesos relacionados con la patogénesis de la EA, como el proceso de agregación del péptido beta-amiloide. Nuevos y futuros estudios buscarán sintetizar más análogos y caracterizar la inhibición de aquellos que resulten de interés, así como mejorar su estabilidad y biodisponibilidad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Carvajal FJ y Inestrosa NC, 2011. Interactions of AChE with $A\beta$ aggregates in Alzheimer's brain: therapeutic relevance of IDN 5706. *Front. Mol. Neurosci.*

Ellman y col., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Metah y col., 2012. New

Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Hindawi Publishing Corporation International Journal of Alzheimer's Disease Volume 2012, Article ID 728983, 8 pages.

Siano y col., 2014. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J Nat Prod.* 2014 Apr 25;77(4):831-41. doi: 10.1021/np400931.