

Potencial terapéutico de extractos de anfibios del litoral argentino: optimización y evaluación de la actividad inhibitoria frente a la enzima MAO B

Aimaretti, Florencia

Laboratorio de Péptidos Bioactivos- Departamento de Química Orgánica- FBCB-UNL

Director: Siano, Álvaro Sebastián

Codirectora: Húmpola María Veronica

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

Las Monoamino-oxidasas (MAO) A y B son enzimas mitocondriales responsables de la desaminación oxidativa de varias monoaminas, entre las que se encuentran la serotonina, la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina, importantes neurotransmisores del SNC y SNA. La gran afinidad de MAO B por bencilaminas y feniletilaminas (Ma y cols., 2004) denota su importancia en la degradación de monoaminas, y por lo tanto en la desactivación de estos neurotransmisores. Esto es de vital importancia para mantener el estado mental normal (Sullivan y cols., 2004). Es por ello que la regulación de la actividad de la MAO B es responsable del enraizado interés en los fármacos Inhibidores de la MAO para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y en especial de la Enfermedad del Parkinson (EP) (Riederer y cols., 2004; Guay, 2006).

La EP constituye actualmente la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, tras la enfermedad de Alzheimer. En esta enfermedad se ven afectadas las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra encargadas del buen funcionamiento de los circuitos motores cortico-subcorticales, provocando una disfunción preferentemente motora. Actualmente, el tratamiento de la EP consiste en la administración de L-DOPA junto con inhibidores de las MAOs no selectivos, previniendo así la degradación de la dopamina por parte de la MAO. Sin embargo, efectos secundarios se vieron asociados al uso de estos inhibidores no selectivos. Por tal motivo, la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos de la MAO-B que puedan ser propuestos como posibles fármacos para el tratamiento de la sintomatología de la EP es primordial para mejorar las terapias existentes.

OBJETIVOS

General: Poner a punto un ensayo en microplaca con el que se pueda evaluar selectivamente la actividad enzimática de la MAO B con el fin de seleccionar extractos de anfibios con potencial inhibitorio de dicha enzima.

Específicos:

- Optimizar el protocolo para obtener un extracto mitocondrial que contenga las MAOs a partir de cerebro de rata aptas para ensayos bioquímicos.
- Identificar las condiciones óptimas de sustratos y volúmenes a los fines de desarrollar una técnica eficiente.
- Evaluar extractos de anfibios de diferentes especies como potenciales candidatos para el aislamiento de compuestos con actividad inhibitoria de la MAO B.

METODOLOGÍA

Título del Proyecto: Agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas: Diseño de péptidos y peptidomiméticos con actividad anticolinesterásica

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Aislamiento de la fracción mitocondrial de cerebro de rata

Las ratas Wistar fueron sacrificadas mediante decapitación con guillotina, inmediatamente se procedió a la extracción de los cerebros y al lavado de los mismos por inmersión en Buffer fosfato pH 7,4 conteniendo sacarosa 133,6 mM. Luego se realizó un homogenizado manual del tejido cerebral con la solución buffer anteriormente descrita. A continuación, mediante centrifugación diferencial se obtuvo la fracción mitocondrial (Soto-Otero y col., 2001). Con el fin de optimizar la técnica de aislamiento para obtener extractos enriquecidos en las enzimas de interés, libres de compuestos interferentes y, a su vez, que se mantengan estables por un periodo de tiempo considerable, se evaluaron distintas condiciones en cuanto a velocidades, tiempos de centrifugación, y formas de almacenamiento. La concentración de proteína de los extractos mitocondriales se determinó por el método del ácido bicinónico.

Desarrollo del ensayo selectivo para evaluar actividad enzimática de la MAO B

En la bibliografía existen varios reportes de ensayos que permiten evaluar la actividad enzimática de la MAO B. El principal problema es que la mayoría utiliza volúmenes finales grandes (cerca de los 2 mL) (Heinonen y col., 1997; Weissbach y col., 1959). Cuando se quiere ensayar la actividad enzimática de la MAO B frente a diferentes compuestos, y a distintas concentraciones, se necesita realizar una batería de ensayos, lo que resulta engorroso y conlleva una gran cantidad de reactivos y muestra, siendo poco conveniente para un ensayo preliminar de screening de actividad inhibitoria.

Por tal motivo, se adaptó el ensayo a una técnica que pueda ser desarrollada en microplacas usando un volumen pequeño (menor a 200 μ L). La técnica seleccionada consiste en reacciones acopladas. En primer lugar, la Bencilamina sufre una desaminación oxidativa catalizada por la MAO B que da como productos benzaldehído, amoníaco y peróxido de hidrógeno (Christ y col., 1973).

El peróxido de hidrógeno reacciona con O-Dianisidina (cromógeno) en una reacción catalizada por la peroxidasa de rábano (horseradishperoxidase, HRP) para dar un compuesto de color naranja, cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente (Kireyko y col., 2005).

Una vez elegida la técnica, se planteó como volumen final 100 μ L y tomando como referencia el kit de Cellbiolabs, INC (OxiSelect™ Monoamine Oxidase Assay Kit), se ajustaron los volúmenes de cada reactivo para poder utilizar la mínima cantidad posible. Además, los resultados se midieron a tres longitudes de onda 405, 450 y 540 nm para hallar la longitud de onda más adecuada.

A continuación, se realizó el ensayo con concentraciones finales de bencilamina y O-dianisidina de 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; y 32 mM. El objetivo de esta prueba fue el de determinar la concentración óptima de sustrato a utilizar para obtener una reacción colorimétrica confiable. Finalmente, y con el objetivo de comprobar que el ensayo es selectivo y solo la actividad enzimática de la MAO B es responsable del cambio de color, se realizó el ensayo en presencia de seleginina, un inhibidor comercial selectivo de la MAO B.

Evaluación de extractos

Finalizada la puesta a punto y optimización, se utilizó la técnica para realizar un ensayo de screening de la actividad inhibitoria de 11 extractos de piel de anfibios de diferentes especies.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Condiciones finales para la centrifugación diferencial

Se siguieron diferentes técnicas de sedimentación de la fracción nuclear. Se probaron velocidades de centrifugación desde los 500 a los 1500 g y se variaron los tiempos de 3 a 15 minutos. La velocidad de centrifugación para sedimentar la fracción “nuclear” óptima fue de 1000 g durante 5 minutos.

Sobre los sobrenadantes, y con el objetivo de obtener la fracción mitocondrial, se ensayaron diferentes rangos de velocidades (desde los 10000 a los 20000 g) y rangos de tiempo (desde los 5 a los 15 minutos). Finalmente, se centrifugaron los sobrenadantes obtenidos a 12.500 g y a 4 °C durante 15 minutos para obtener las mitocondrias.

Con esta combinación de tiempo y velocidad de centrifugación se obtuvieron los mejores rendimientos de fracción mitocondrial la cual contiene las MAO, logrando una purificación parcial de dichas enzimas.

Finalmente, se probó almacenar los sedimentos sin reconstituir y reconstituidos en una disolución tampón de fosfato pH 7,4 y KCl 72,6 mM (isotónica) y ambos fueron almacenados a -80 °C. Solamente la fracción reconstituida mostró actividad a lo largo del tiempo, mientras que la no reconstituida perdió la actividad luego de varios días de almacenamiento.

Determinación de la concentración óptima de Bencilamina y O-dianisidina

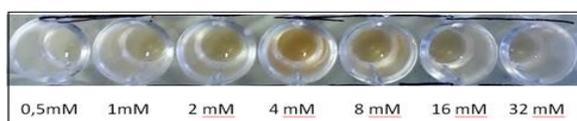


Figura 1: Foto del ensayo para determinar la concentración de bencilamina.

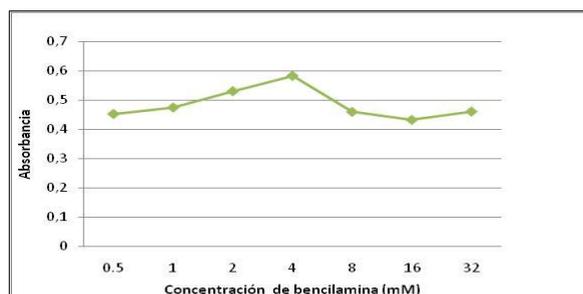


Gráfico 1: Concentración final de bencilamina vs absorbancia.

A fin de optimizar las concentraciones de ambos sustratos, y manteniendo la concentración de enzima óptima según bibliografía, se evaluaron concentraciones crecientes de Bencilamina y de O-dianisidina (desde 0,5 a 32 mM).

En la Figura 1 se muestra una foto del ensayo para el caso de labencilamina en la que se puede ver el color obtenido al final de la reacción colorimétrica para cada concentración ensayada. Luego de leer a 405nm se graficaron las absorbancias obtenidas con respecto a cada concentración (Gráfico 1). Tanto en la imagen como en el gráfico se observó que la concentración que arrojó un color más intenso y por lo tanto un mayor valor de absorbancia fue la de 4mM.

En el caso de la O-dianisidina la concentración final óptima fue de 1mM.

Protocolo para evaluar actividad enzimática de MAO B

Luego de determinar las concentraciones óptimas de los diferentes reactivos, el ensayo final se describe a continuación:

En los pocillos en los que se ensayó la actividad basal de la enzima se colocaron 45 μ L Solución stock de fracción mitocondrial y 5 μ L de agua mili Q. En los que restan, además de los 45 μ L Solución stock de fracción mitocondrial se agregaron 2,5 μ L de Agua mili Q y 2,5 μ L de la muestra a ensayar a las concentraciones deseadas. También se realizó un blanco de reactivos en donde se colocó 50 μ L de agua mili Q.

Se incubó a 30 °C por 30 minutos y luego se agregaron 10 μ L de solución stock de HRP 5 U/ml (excepto en el blanco de reactivos), 20 μ L solución de Bencilamina y 20 μ L de solución de O-Dianisidina.

Finalmente, luego de incubar a 30°C durante 60 minutos se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm ya que de las tres ensayadas fue la que mejor rango de valores brindó. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la ecuación 1.

$$\%I = 100 - \left(\frac{\text{Absorbancia Muestra} - \text{Absorbancia Blanco}}{\text{Absorbancia Basal} - \text{Absorbancia Blanco}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Selectividad del ensayo

Al realizar el ensayo en presencia de seleginina no se desarrolla la reacción de color, dando una inhibición del 100% a las distintas concentraciones ensayadas, reafirmando que la MAO B es la responsable de la generación de color en el ensayo.

Ensayo de screening

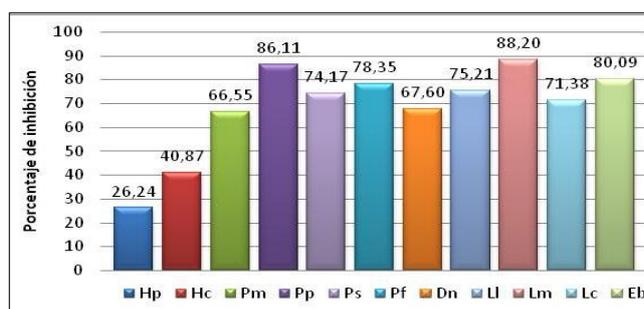


Gráfico 2: Porcentaje de inhibición de los extractos

Utilizando la técnica puesta a punto anteriormente se evaluó la actividad inhibitoria de 11 extractos de pieles de ranas de las especies: *Hypsiboaspulchellus*(Hp), *Hypsiboascordobae*(Hc), *Pseudis minuta* (Pm), *Pseudisparadoxa*(Pp), *Physalaemus santafesinus*(Ps), *Pseudopaludicula falsipes*(Pf), *Dendrophus nanus*(Dn), *Leptodactylus latrans*(Ll), *Leptodactylus mystacinus*(Lm), *Leptodactylus chaquensis*(Lc),

Elachistocleis bicolor (Eb).

La concentración final de extracto ensayada fue de 435 µg/mL. El gráfico 2 muestra el porcentaje de inhibición obtenido con cada extracto. La mayoría de los extractos de pieles de anfibios presentó un porcentaje de inhibición de más del 60%.

En conclusión, se ha logrado un protocolo eficiente para obtener un extracto de MAOs parcialmente purificadas con buenos rendimientos. Adicionalmente la optimización de la técnica para evaluar la actividad inhibitoria selectiva de MAO B fue exitosa, ya que, además de obtener resultados prometedores, se ha comprobado que el ensayo es de gran utilidad en la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria de la MAO B, permitiendo seleccionar las especies de anfibios más promisorias para comenzar con la purificación de sus extractos con el objetivo de aislar los compuestos responsables de esta actividad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Amrein, R. 1989. The Pharmacology of Reversible Monoamino Oxidase Inhibitors. *British Journal of Psychiatry*. 155: Supplement 6: 66-71

Jameel E., Umar T., Kumar J., Hoda N., 2016 Coumarin: a privileged scaffold for the design and development of antineurodegenerative agents. *Chem Biol Drug Des* 87: 21-38.

Kangkang Z., Zhongduo Y., Jie S., Zongmei S. y Yin S., 2016. A peroxidase-linked spectrophotometric assay for the detection of monoamine oxidase inhibitors. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 15: 131-139.

Méndez-Álvarez E, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I y López-Ribadulla Lamas M. 1997. Inhibition of brain monoamine oxidase by adducts of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline with components of cigarette smoke. *Life Science* 60: 1719-1727.

Riederer P., Danielczyk W., Grunblatt E., 2004. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 25: 271-277.