



## RESUMEN EXTENDIDO

### ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER: MODULACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VÍAS PATOLÓGICAS A PARTIR DE EXTRACTOS DE RHINELLA ARENARUM

Aimaretti, Florencia<sup>1</sup>; Aschemacher, Nicolás<sup>1</sup>; Rietmann, Álvaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Péptidos Bioactivos – Departamento de Química Orgánica – FCB-UNL

Director/a: Spinelli, Roque

Codirector/a: Siano, Álvaro

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Alzheimer, piel de anfibio, productos naturales

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia, caracterizada por la pérdida selectiva de funciones neuronales y cerebrales normales (Ballard y cols., 2011). Su mecanismo de patogénesis multifactorial aún no se comprende en su totalidad, y actualmente los blancos terapéuticos para su tratamiento incluyen las enzimas acetil y butiril colinesterasas (AChE y BChE), monoamino oxidasa-B (MAO-B), y el estrés oxidativo (Jalili-Baleh y cols., 2018). Las enzimas AChE y BChE son las principales encargadas de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en el cerebro (Greig y cols., 2002). Actualmente, los inhibidores de las enzimas colinesterasas constituyen el único tratamiento sintomático indicado para la EA, y los esfuerzos en el desarrollo de nuevas drogas continúan enfocándose en éstos (Chen y cols., 2014).

Por otro lado, la enzima MAO-B está involucrada en la desaminación oxidativa de neurotransmisores, incrementando la producción de radicales libres y por ende causando estrés oxidativo. En consecuencia, la inhibición de MAOs, en conjunto con el uso de agentes antioxidantes para reducir los efectos tóxicos del estrés oxidativo, son capaces de retrasar y prevenir desórdenes neurodegenerativos (Santos y cols., 2016).

Considerando la compleja patogénesis de la EA, actualmente la búsqueda de tratamientos efectivos anti-EA se enfoca en la modulación simultánea de las diferentes vías asociadas.

Los anfibios anuros, en respuesta a la contaminación ambiental, el estrés o al ataque de depredadores, secretan a través de sus glándulas granulares diversos compuestos bioactivos (entre los cuales se encuentran péptidos, proteínas y alcaloides) como mecanismo de defensa. En los últimos años, el aislamiento de péptidos provenientes de estas secreciones ha llevado al desarrollo de agentes terapéuticos con diversas aplicaciones en salud humana, entre ellos: antimicrobianos, antitumorales, inmunomoduladores, antidiabéticos, analgésicos y antiinflamatorios (Conlon y cols., 2014).

## OBJETIVO

Evaluar la actividad de la especie *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) como fuente de productos naturales multiobjetivo que generen una modulación simultánea de los blancos terapéuticos involucrados en la EA.

Título del proyecto: Agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas: Diseño de péptidos y peptidomiméticos con actividad anticolinesterásica  
Instrumento: PICT-2017-0035  
Año convocatoria: 2017  
Organismo financiador: ANPCyT  
Director/a: Siano, Álvaro

## METODOLOGÍA

### Obtención de los extractos

Se recolectaron especímenes adultos de *Rhinella arenarum*, con posteridad a precipitaciones, en la región del Litoral argentino. Para obtener los extractos bioactivos, se utilizaron dos métodos de extracción diferentes:

- Extracción con etanol-agua-ácido acético (ES) a partir de la piel removida de los especímenes investigados. El animal fue sacrificado siguiendo normativas internacionales ASIH y con el aval del comité de ética vigente de la FBCB-UNL.
- Estimulación eléctrica transcutánea (EET) de la superficie dorsal del anfibio con un electrodo bipolar de platino 21G, produciendo microcorrientes que contraen los músculos que rodean a las glándulas granulares, liberando las secreciones. Posteriormente los especímenes fueron liberados.

Ambos extractos (ES y EET), fueron liofilizados y conservados a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### Purificación y análisis de los extractos

Inicialmente, los extractos se analizaron y purificaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Se utilizaron columnas Atlantis C18 y Beckman C8, con un gradiente lineal de 5-80 % de ACN/H<sub>2</sub>O con 0,1 % de TFA, a flujo de 0,8 ml ml<sup>-1</sup> para el análisis y de 3 ml/min para la purificación. La detección fue realizada a 220 nm y 280 nm.

Luego, se analizaron los extractos mediante cromatografía en capa delgada (TLC), con una mezcla de corrida butanol: ácido acético: agua (55,6: 22,2: 22,2), y utilizando reveladores específicos de grupos funcionales: ninhidrina (para la detección de péptidos y/o proteínas) y Draggendorf (alcaloides). Finalmente, se determinó la concentración proteica a través del método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando como estándar una curva de calibrado de ASB (Smith y cols., 1985).

### Actividad biológica frente a los blancos terapéuticos de la EA

Se evaluó la actividad biológica de los extractos obtenidos a partir de las dos técnicas diferentes (ES y EET), y de sus purificados, frente a las enzimas colinesterasas (AChE y BChE) y MAO-B, así como también su actividad antioxidante.

Actividad inhibitoria de colinesterasas: el potencial inhibitorio de los extractos contra las enzimas AChE y BChE fue determinado siguiendo el método de Ellman (Ellman y cols., 1961), con ligeras modificaciones. Para el ensayo inhibitorio de AChE, se agregaron concentraciones decrecientes de los diferentes extractos en una placa de 96 pocillos, seguido de la adición de AChE en buffer fosfato (pH 7,5). Luego de 30 minutos de incubación a 25°C, se agregaron en

cada pocillo una solución de DTNB y acetiltiocolina iodada. La absorbancia del producto coloreado se midió a 405 nm en un lector de microplacas.

El mismo procedimiento se aplicó para el ensayo inhibitorio de BChE, con modificaciones en la enzima y sustrato: BChE de suero humano y S-butiltiocolina iodada, respectivamente.

Los ensayos fueron realizados por triplicado; frente a un blanco de enzima y de muestra y utilizando galantamina como control positivo. En ambos casos, se calculó el porcentaje de inhibición (%I) y la IC<sub>50</sub> de las enzimas, definida como la concentración a la cual el extracto produce el 50% de la inhibición enzimática.

Actividad inhibitoria de MAO-B: en este caso, se siguió el método descrito por Soto-Otero y cols., con ligeras modificaciones. Se incubaron en una placa de 96 pocillos, los extractos en concentraciones decrecientes con MAO-B (aislada a partir de la fracción mitocondrial de tejido cerebral de ratón). Después de 30 minutos a 30°C, se añadió una solución de HRP, benzilamina y o-dianisidina en cada pocillo; y se incubó durante 60 minutos. La absorbancia del producto coloreado se midió a 405 nm en un lector de microplacas. Nuevamente, se calculó el porcentaje de inhibición (%I) y la IC<sub>50</sub> de la enzima.

Actividad antioxidante: la actividad antioxidante de los extractos se evaluó a partir del ensayo de entrapamiento del radical DPPH (Memarpoor-Yazdi, M. y cols., 2013), con leves modificaciones. Brevemente, en una placa de 96 pocillos, se incubaron los extractos, con metanol y DPPH, durante 30 min en oscuridad. Se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas, utilizando como control positivo el ácido ascórbico.

## Toxicidad

Actividad hemolítica: se ensayó la actividad lítica de los diferentes extractos frente a glóbulos rojos humanos (GRh). Para ello, los GRh se lavaron tres veces con solución fisiológica comercial (SFC); a continuación, los extractos disueltos en SFC se agregaron sobre tubos Eppendorf conteniendo una solución de GRh suspendidos en SFC. Los tubos se incubaron por 1 h a 37 °C y luego se centrifugaron a 1000 G durante 5 min. Alícuotas del sobrenadante fueron transferidas a placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 405 nm. El 0 y 100 % de hemólisis fueron determinados en SFC y en 1 % de Tritón-X 100, respectivamente.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Mediante la purificación por RP-HPLC, se obtuvieron seis fracciones para el extracto de ES (I, II, III, IV, V, VI) y siete para el de EET (I, MI, II, III, IV, V y VI).

La *Tabla 1* muestra los valores IC<sub>50</sub> en µg ml<sup>-1</sup> para la inhibición enzimática de AChE, BChE y MAO-B, y actividad antioxidante; tanto de los extractos completos como de los purificados.

El extracto completo obtenido mediante ES demostró ser activo tanto frente a AChE y BChE, como a MAO-B, con valores de IC<sub>50</sub> de 304, 70 y 203 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. En cuanto a EET, el extracto completo presentó actividad inhibitoria frente a las enzimas estudiadas, siendo más activo frente a BChE (23 µg ml<sup>-1</sup>) que frente a AChE (991 µg ml<sup>-1</sup>) y MAO-B (232 µg ml<sup>-1</sup>).

De los purificados de ES, las fracciones II y III presentaron una moderada actividad frente a ambas enzimas colinesterasas, con una marcada selectividad hacia BChE. Para MAO-B, las fracciones I, II y III resultaron las más activas, con valores de IC<sub>50</sub> entre 117 y 275 µg ml<sup>-1</sup>.

Respecto a EET, las fracciones I, MI, II y III fueron las de mayor actividad frente a AChE y BChE, con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 11 y 474 µg ml<sup>-1</sup>. Notablemente, tres de estas cuatro fracciones (I, MI y II) también presentaron elevada actividad inhibitoria frente a MAO-B,

con valores de IC<sub>50</sub> entre 132 y 149 µg ml<sup>-1</sup>. Así, dichas fracciones representan candidatos prometedores para el desarrollo de agentes multiobjetivo frente a colinesterasas y MAO-B.

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> (µg ml<sup>-1</sup>) de los extractos completos y purificados, frente a los blancos de la EA

|     |        | EC  | Fracciones |     |      |     |       |       |      |
|-----|--------|-----|------------|-----|------|-----|-------|-------|------|
|     |        |     | I          | MI  | II   | III | IV    | V     | VI   |
| ES  | AChE   | 304 | >1250      | -   | 1106 | 988 | >1250 | >1250 | 867  |
|     | BChE   | 70  | 214        | -   | 46   | 365 | 379   | 424   | >500 |
|     | MAO-B  | 203 | 117        | -   | 159  | 275 | 869   | 869   | 584  |
|     | Antiox | 7   | 9          | -   | 10   | NE  | NI    | NE    | NE   |
| EET | AChE   | 991 | 114        | 259 | 178  | 474 | 132   | NI    | NI   |
|     | BChE   | 23  | 15         | 17  | 17,5 | 11  | >500  | NI    | NI   |
|     | MAO-B  | 232 | 132        | 149 | 143  | 725 | 698   | 434   | 869  |
|     | Antiox | 7   | 6          | 5   | 6    | NE  | NE    | NE    | NE   |

NI: no inhibe/no presenta actividad antioxidante; NE: no ensayado

Ambos extractos completos (ES y EET) probaron ser altamente antioxidantes, con un IC<sub>50</sub>= 7 µg ml<sup>-1</sup>. Para ES, de las fracciones purificadas ensayadas (I, II y IV), las dos primeras exhibieron gran capacidad de entrapamiento de radicales libres, con valores de IC<sub>50</sub> de 9 y 10 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Para EET, se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> entre 5 y 6 µg ml<sup>-1</sup> para las fracciones I, MI y II, notablemente activas frente a los demás blancos terapéuticos estudiados.

En cuanto a la caracterización analítica, los porcentajes de proteínas de los extractos completos fueron de 24 y 76 para ES y EET, respectivamente. Respecto de la TLC, el análisis a 254 y 365 nm mostró la compleja composición de los extractos y purificados, y su polaridad variable. El revelado con ninhidrina exhibió la presencia de péptidos en ambos extractos completos y fundamentalmente en las fracciones I y MI de EET; de manera similar, el revelado con Dragendorff denotó la presencia de alcaloides principalmente para el extracto y fracciones purificadas de EET. Además, los extractos resultaron ser no hemolíticos frente a eritrocitos humanos, a las concentraciones ensayadas.

Los resultados alcanzados en este trabajo permiten concluir que la especie *Rhinella arenarum* de la familia Bufonidae presenta compuestos activos capaces de actuar sobre cuatro importantes vías de la EA, representando su estudio de gran interés para futuras terapias multiobjetivo. Por otro lado, de los dos métodos extractivos estudiados, el método no invasivo de EET, que no requiere sacrificio animal, permitió obtener los compuestos de mayor actividad, tanto frente a AChE, BChE y MAO-B, como antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Ghirardi, R., & López, J.** (2017) *Anfibios de Santa Fe*. Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina.
- Tyler, M. J., Stone, D. J. M., & Bowie, J. H.** 1992. A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 28(4), 199-200
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., jr., & Featherstone, R. M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95
- Knez, D., Sova, M., Košak, U., & Gobec, S.** (2017). Dual inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases for Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*, 9(8), 811-832.
- Santos, M. A., Chand, K., & Chaves, S.** 2016. Recent progress in repositioning Alzheimer's disease drugs based on a multitarget strategy. *Future Medicinal Chemistry*, 8(17), 2113-2142