

CAPACIDAD INHIBITORIA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS AISLADOS A PARTIR DE ANFIBIOS ANUROS FRENTE A LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA

Roque Spinelli

Tesinista - Laboratorio de Péptidos Bioactivos - Departamento Química Orgánica de la FCB – UNL. rspinelli@fcb.unl.edu.ar

Área temática: Ciencias Biológicas.

Sub-área: Bioquímica.

Proyecto: CAI+D 2011: Estrategias químicas y biofísicas para transformar péptidos bioactivos en compuestos con aplicaciones terapéuticas. FCB-UNL. Código: 50120110100064

INTRODUCCIÓN

En respuesta a la contaminación ambiental, estrés o al ataque de depredadores, los anfibios anuros secretan un complejo cóctel químico a través de estructuras especializadas de la piel llamadas glándulas granulares; estas secreciones contienen gran cantidad de componentes químicos bioactivos, entre los cuales se incluyen péptidos y proteínas, alcaloides y aminos biógenas. Estos compuestos podrían dar lugar a nuevos fármacos para uso humano o veterinario, dado que el espectro de actividad biológica de los mismos es muy amplio (Tyler et al., 2007).

Argentina, y especialmente las provincias de Santa Fe y Entre Ríos poseen una gran diversidad de anfibios anuros que generan un sinnúmero de oportunidades en este campo de estudio.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta con un deterioro cognitivo caracterizándose por una pérdida de la memoria inmediata y capacidades mentales, a medida que las células nerviosas mueren, y diferentes zonas del cerebro se atrofian (Hostettmann et al., 2006). Una de las estrategias para el tratamiento de la EA es contrarrestar el deterioro de la actividad colinérgica en el cerebro usando inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La misma regula la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en ácido acético y colina. Los inhibidores de la AChE tienen efectos beneficiosos sobre los síntomas cognitivos, funcionales y de comportamiento de la enfermedad del Alzheimer (Ito et al., 2010).

OBJETIVOS

- a) Evaluar la actividad inhibitoria sobre la AchE de extractos de especies de anfibios anuros, pertenecientes a las familias Hylidae y Leptodactylidae.
- b) Caracterizar los compuestos de mayor actividad mediante técnicas cromatográficas: Cromatografía líquida en fase reversa (HPLC) y Cromatografía en capa delgada (CCD).

METODOLOGÍA

Especies estudiadas

Se ensayaron extractos de pieles de anfibios de las especies *Hypsiboas pulchellus* (H.p), *Pseudis minuta* (P.m) e *Hypsiboas cordobae* (H.c) pertenecientes a la familia Hylidae, y de *Leptodactylus chaquensis* (L.c) perteneciente a la familia Leptodactylidae.

Obtención de los extractos

Los extractos fueron obtenidos mediante extracción con solventes (ES), siguiendo protocolos ya optimizados y avalados por la normativa internacional vigente (ASIH 2004)

Los extractos obtenidos mediante ES fueron purificados parcialmente mediante diálisis, utilizando membranas de cut off de 1 y 2 KDa.

Ensayo en microplaca para determinar actividad de la AChE

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de la AChE se utilizó un micrométodo basado en el ensayo de Ellman modificado (Ellman et al., 1961). La actividad enzimática se determinó mediante el incremento de color producido por la tiocolina, procedente de la hidrólisis de la acetiltiocolina, cuando ésta reacciona con el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) para formar el anión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, de color amarillo (*Figura 1*).

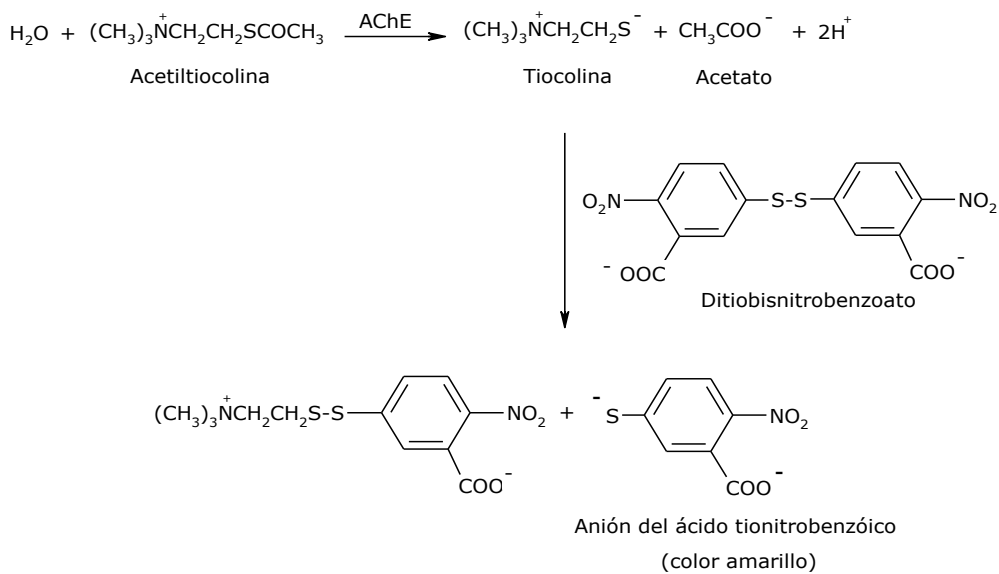


Figura 1. Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa.

Técnica operatoria

Para el ensayo se disolvió la enzima comercial, acetilcolinesterasa, en buffer fosfato a PH=7.5 hasta lograr una concentración de 0.25U/mL. Como sustrato se utilizó ioduro de acetiltiocolina 0.24mM y como reactivo de color DTNB 0.2mM; los reactivos se disolvieron en Na₂PO₄ 0.04mM y el pH se ajustó a 7.5. Todos los reactivos utilizados fueron marca Sigma. Los extractos de pieles de anfibios fueron disueltos en agua Milli Q.

En una placa de 96 pocillos, se incubaron 50µL de concentraciones crecientes de los diferentes extractos y fracciones (1.25, 2.5, 5mg/mL) junto con 50µL de la solución enzimática, durante 30 minutos a 25°C. Posteriormente se añadieron 100µL de la solución de sustrato y DTNB. Se midió la absorbancia del color amarillo a los cinco minutos del inicio de la reacción, en un lector de microplacas Elisa, a 405nm. Se calculó el porcentaje de inhibición (%) y la concentración inhibitoria media (IC₅₀).

Los ensayos fueron realizados por triplicado y frente a un blanco de enzima y de muestra. Como controles positivos se utilizaron Galantamina y Maloxón a una concentración de 200 y 100 µM, respectivamente (Rhee et al., 2000; Selmi et al., 2012).

Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95%.

Técnicas cromatográficas

Para el análisis de los extractos completos y de las fracciones obtenidas por diálisis se utilizó Cromatografía líquida en fase reversa (HPLC) utilizando columnas de C₁₈. Como solventes se utilizaron agua y acetonitrilo (ACN) con un gradiente de ACN/H₂O de 5 al 80%, con un flujo de 0.8 mL/min, mediante detección UV a 220nm. Para la caracterización mediante CCD, se utilizaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄; y como solvente de corrida, butanol:ácido acético:agua (55.6: 22.2: 22.2). Para la detección de compuestos proteicos/peptídicos y de alcaloides se reveló con Ninhidrina y Reactivo de Dragendorff respectivamente.

RESULTADOS

Análisis de inhibición

Los porcentaje de inhibición (%) y la IC₅₀ de los extractos completos (EC) y purificados frente a la AchE se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. %I e IC₅₀ frente a AchE de los extractos completos y fracciones purificadas procedentes de las especies ensayadas.

Especies	Extractos	5mg/mL	2.5mg/mL	1.25mg/mL	IC ₅₀
Familia Hylidae					
<i>H. pulchellus</i>	EC	21.46	6.82	3.51	18.3
	<1KDa	4.92	57.38	74.52	0.43
	<2 KDa	0	56.03	56.35	0.97
<i>H. cordobae</i>	Ec	56.42	53.98	40.15	3.86
	<1 KDa	0	21.75	35.40	2.28
	<2 KDa	14.05	51.51	56.11	0.98
<i>P. minuta</i>	EC	68.03	31.67	12.57	2.35
	<1 KDa	0	34.05	43.89	1.60
	<2 KDa	0	35.87	51.67	1.17
Familia Leptodactylidae					
<i>L. chaquensis</i>	EC	21.18	33.41	31.63	4.98
	<1 KDa	6.03	23.49	36.03	2.22
	<2 KDa	0	48.89	31.67	2.61

EC: Extracto completo

Se consideraron relevantes los porcentajes de inhibición mayores al 40%. Dentro de la familia Hylidae, el EC de H.p no presentó un porcentaje de inhibición considerable frente a AchE, en cambio sus fracciones purificadas <1 y 2 KDa, alcanzaron valores del 70. Con las especies P.m y H.c se alcanzaron valores máximos de inhibición del 56 y 68% para los EC y asimismo valores notables para sus fracciones purificadas.

En lo que respecta a la especie de la familia Leptodactylidae estudiada, con el extracto de L.c se obtuvieron porcentajes de inhibición del 48%, en la fracción <2KDa.

La variación en la actividad inhibitoria al variar la concentración del extracto puede adjudicarse a fenómenos de agregación debido a la hidrofobicidad que los extractos poseen o también podría deberse a un comportamiento hormético.

Análisis cromatográfico

En el análisis de los perfiles de HPLC, se observó que los extractos están constituidos por un alto y variado número de compuestos. Analizando las fracciones

obtenidas por diálisis (<1 y 2 KDa.), las que presentaron una mayor actividad frente a la AchE, se observó la presencia de compuestos polares, que eluyeron con 20% de ACN y bajos tiempos de retención (0-10 minutos).

El análisis mediante CCD de los extractos parcialmente purificados evidenció la presencia de compuestos de naturaleza peptídica que reaccionaron con el revelador ninhidrina, mientras que en los extractos completos se observó además la presencia de alcaloides, empleando el reactivo de Dragendorff.

CONCLUSIONES

De los extractos y dializados de pieles de anfibios anuros investigados, todos mostraron capacidad inhibitoria de la AchE, siendo los pertenecientes a la familia Hylidae los más activos, en especial las fracciones menores a 1 y 2 KDa.

De la caracterización parcial se puede concluir que estos extractos poseen compuestos de naturaleza proteica, lo cual sería de gran interés para futuras aplicaciones. Estos extractos continúan siendo estudiados, a fin de caracterizar e identificar los compuestos responsables de la actividad biológica detectada.

BIBLIOGRAFÍA

ASIH. 2004. Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. Herpetological animal care and use committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Washington DC, USA.

Ellman GL; Courtney KD; Andres VJr; Featherstone RM. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Hostettmann K.; Borloz A.; Urbain A.; Marston A. 2006. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr. Org. Chem.* 10: 825-847.

Ito K.; Corrigan B., French J.; Fullerton T.; Tensfeldt T. 2010. Disease progression meta-analysis model in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 6: 39-53

Tyler M.J.; Wassersug R.; Smith B. 2007. How frogs and humans interact: Influences beyond habitat destruction and global warming. *App. Herpetol.* 4: 1-18.

Rhee K.; Van de Meent M.; Ingkaninan K.; Verpoorte R. 2000. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A* 915: 217-223

Selmi S, El-Fazaa S, Gharbi N. 2012. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. *Environ. Toxicol. Phar.* 34: 753-760