

## 32. Salud Humana

### **Diseño racional, síntesis, estudios cinéticos y *docking* molecular de nuevos péptidos con actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa**

Sanchis, Iván<sup>1</sup>; Aimaretti, Florencia María<sup>1</sup>; Spinelli, Roque<sup>1</sup>; Siano, Álvaro Sebastián<sup>2</sup>

<sup>1</sup> autor; <sup>2</sup> orientador

sanchisivan@fbc.unl.edu.ar; asiano@fbc.unl.edu.ar

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

#### **Resumen**

Las colinesterasas representan el principal blanco molecular en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer (EA), mediante el uso de inhibidores. La acetilcolinesterasa (AChE) resulta de interés particular ya que participa tanto en la hidrólisis de la acetilcolina mediante su sitio catalítico como en la formación de las placas seniles mediante su sitio aniónico periférico (PAS), cuya inhibición se considera la estrategia principal para el tratamiento. Algunos péptidos inhibidores fueron hallados en pieles de anfibios.

En este trabajo, se estudió un péptido inhibidor (Hp-1935) aislado de *Hypsiboas pulchella*, anuro del Litoral argentino. A partir de su secuencia (19 aminoácidos) se diseñaron 5 análogos más cortos para encontrar la región más importante en la inhibición y se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida Fmoc. Se determinó el mecanismo inhibitorio del Hp-1935 y su  $K_i$  con ensayos enzimáticos cinéticos y estudios de *docking* flexible. Se realizaron además ensayos inhibitorios de punto final con todos los péptidos para determinar capacidad inhibitoria y  $CI_{50}$ . Se estimó la citotoxicidad de las secuencias con ensayo de lisis de eritrocitos humanos.

Se encontró que el mecanismo inhibitorio del Hp-1935 es de tipo no competitivo con una  $K_i$  de 85,18  $\mu\text{M}$  (73,7-99,2) y el sitio de interacción es el PAS. El péptido inhibió la enzima entre 84,4% y 26,0% con una  $CI_{50}$  de 99,17  $\mu\text{M}$  (81,47-120,71). Entre los análogos hay uno que conserva el 81,3% de capacidad inhibitoria a 400  $\mu\text{M}$  y corresponde a la región central. Este péptido no resultó hemolítico, al igual que el Hp-1935. Estos resultados proponen al Hp-1935 y al péptido correspondiente a su región central como buenos candidatos para el desarrollo de nuevo fármacos para el tratamiento de la EA.

**Palabras clave:** Alzheimer, colinesterasas, péptidos, *docking*, diseño racional.

## Introducción

La demencia es un síndrome (generalmente de naturaleza crónica o progresiva) caracterizado por el deterioro de la función cognitiva que no constituye una consecuencia del envejecimiento normal. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia (entre un 60% y un 70% de los casos). Afecta a nivel mundial a unas 47,5 millones de personas, cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos, provocando importantes repercusiones sociales y económicas. En 2015 el costo social total a mundial se estimó en US\$ 818.000 millones, es decir el 1,1% del PBI global. La OMS la reconoce como una prioridad de salud pública (OMS, 2017).

Los dos indicadores más importantes en el diagnóstico de la EA son los depósitos extracelulares de placa del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares de la proteína tau (Murphy y LeVine, 2010). Si bien actualmente no existe una cura para esta enfermedad, los principales esfuerzos para el desarrollo de nuevos fármacos que mejoren su sintomatología o retarden su progreso se basan en los inhibidores de las colinesterasas (acetilcolinesterasa o AChE y butirilcolinesterasa o BChE), ejemplos de estos son el donepezil, la rivastigmina y la galantamina (Rahman y Choudhary, 2015). Las colinesterasas catalizan la rápida hidrólisis del neurotransmisor

acetilcolina, reduciendo su actividad estimuladora del sistema nervioso. Según la hipótesis colinérgica, una exacerbada actividad de estas enzimas en personas con demencia senil conlleva a la pérdida de las funciones cognitivas (Carvajal e Inestrosa, 2011).

Se ha comprobado que la acetilcolinesterasa, además de participar de la función colinérgica, juega también un rol fundamental en la formación de los depósitos  $\beta$ -amiloide que causan la EA. La AChE posee dos sitios de unión: el sitio catalítico (CAS) responsable de la hidrólisis de la acetilcolina, y el sitio aniónico periférico (PAS) que es rico en residuos aromáticos. El PAS, además de estar involucrado en la función catalítica, está directamente implicado en la estimulación de la formación y agregación del péptido  $\beta$ -amiloide y en el aumento de la neurotoxicidad de las fibrillas amiloides (Johnson y Moore, 2006). Está muy bien determinado cómo mediante el sitio PAS la AChE actúa como chaperona en el proceso de agregación del péptido  $\beta$ -amiloide. Estas propiedades convierten a este sitio en un blanco molecular de gran interés para el tratamiento de la EA (Carvajal e Inestrosa, 2011).

En venenos de algunos animales se han encontrado toxinas con actividad anticolinesterásica, en especies poco relacionadas. La primera fue la melitina,

polipéptido pequeño de 26 residuos aminoacídicos aislado a partir del veneno de *Apis mellifera*. A partir del veneno de *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde) se aislaron dos polipéptidos con potente actividad anticolinesterásica: las fasciculinas I y II (FAS) (Rodríguez-Ithurralde y col., 1983), inhibidores del sitio PAS que inhiben tanto la BChE como la AChE de diversas fuentes. Otros péptidos anticolinérgicos reportados se aislaron de pieles de anfibios. Entre estos, se destacan algunos obtenidos a partir de *Hypsiboas pulchella* (rana de zarzal), como el Hp-1971 y el Hp-1935 (Siano et al., 2014 y 2017). Éste último, se aisló como inhibidor de la butirilcolinesterasa. En este trabajo, se tomó esta secuencia y se estudió su acción inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa, con el fin de caracterizar su mecanismo inhibitorio, definir los residuos más importantes y proponer el diseño de nuevos péptidos.

### Objetivos

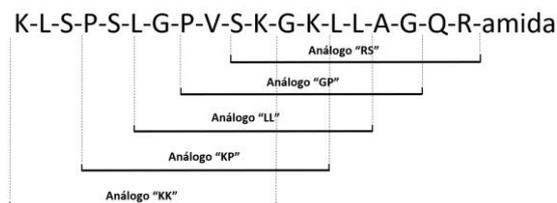
- Sintetizar, mediante la química de síntesis peptídica en fase sólida Fmoc, el péptido Hp-1935, con comprobada actividad inhibitoria de la enzima butirilcolinesterasa y análogos peptídicos con el fin de delimitar la región que contribuye mayormente a la inhibición.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los péptidos sintetizados sobre la enzima acetilcolinesterasa en ensayos de punto

final. Estimar la CI50 de aquellos de mayor interés.

- Estimar la citotoxicidad de los péptidos sintetizados mediante la lisis de eritrocitos humanos.
- Realizar la caracterización de la cinética de inhibición del péptido Hp-1935 (determinación del tipo de inhibición y cálculo de la constante de inhibición  $K_i$ ) de la enzima AChE, mediante un ensayo cinético.
- Realizar estudios teóricos de *docking* flexible del péptido HP-1935 y de los análogos de mayor interés, para complementar el estudio del tipo de inhibición, comprender mejor sus características inhibitorias y plantear las modificaciones químicas más convenientes.

### Materiales y Métodos

Diseño se las secuencias. Con el objetivo de encontrar la porción mínima responsable de la actividad inhibitoria, se diseñaron y sintetizaron 5 análogos de menor tamaño: cuatro de diez aminoácidos y uno de once (ver Figura 1). El diseño racional tuvo como eje principal la obtención de un péptido por cada porción continua de 10 aminoácidos del péptido original, con una diferencia de dos aminoácidos entre un péptido y el siguiente en la secuencia.



**Figura 1.** Secuencia del péptido Hp-1935 y de los análogos diseñados y sintetizados.

**Síntesis.** Los péptidos se sintetizaron como amidas en el C-terminal mediante síntesis en fase sólida (SPPS) con química Fmoc usando la resina Rink SS 1%DVB (Advanced Chemtech). La desprotección del grupo se realizó con piperidina y los acoplamientos con tetrafluorborato de O-(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio (TBTU), en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropiletilamina (DIEA), en dimetilformamida (DMF). La separación de la resina y la eliminación de los protectores se realizarán con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de *scavengers*. Para evaluar la pureza de los productos de síntesis se les realizó una RP-HPLC en un equipo Waters. Se utilizó una columna analítica Atlantis C18 (4,6 x 250 mm) marca Waters. La corrida se llevó a cabo mediante el uso de un gradiente lineal de 5-80 % de ACN (acetonitrilo)/H<sub>2</sub>O con el agregado de 0,1 % de TFA a cada solvente, durante un período de 25 min con un flujo de 0,8 mL/min; la detección fue realizada a 220 nm.

### Estudio de la actividad inhibitoria.

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). Se disolvió la enzima AChE comercial tipo VI-S de *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica) (Sigma-Aldrich), en buffer fosfato a pH=7,5 hasta lograr una concentración de 0,25 U/mL. Como sustrato se utilizó yoduro de acetiltiocolina 0,24 mM y como reactivo de color DTNB 0,2 mM; los reactivos se disolvieron en Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04 mM y el pH se ajustó a 7,5. Los péptidos analizados fueron disueltos en agua Milli-Q. En una placa de 96 pocillos, se incubaron 50µL de concentraciones crecientes de los diferentes péptidos junto con 50µL de solución enzimática, durante 30min a 25°C. Posteriormente se añadieron 100µL de solución de sustrato y DTNB, obteniendo concentraciones finales de 50, 100, 200 y 400 µM para cada péptido. Se midió la absorbancia a los 5 min del inicio de la reacción, en un lector de microplacas ThermoFisher FC Multiskan, a 405 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado y frente a un blanco de enzima y de muestra. Como control positivo se utilizó Galantamina. A partir de estos datos, se calculó la CI<sub>50</sub> mediante la construcción de una gráfica %I-[I] (concentración de inhibidor). Se ajustaron los valores a un modelo logarítmico y a partir de la ecuación de la curva de

regresión se calculó el valor de CI50. Además, se realizó un análisis de varianza de la regresión para estimar el intervalo de confianza del 95% de los parámetros de la curva y de la CI50.

El ensayo cinético del Hp-1935 se realizó siguiendo el protocolo de los ensayos a punto final, pero estudiando la reacción a seis distintas concentraciones de sustrato (0,48–0,03mM finales) y comenzando las lecturas al momento de incorporar el sustrato y el DTNB. Los resultados se estudiaron mediante ajuste de los valores de velocidad de reacción con la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el programa GraphPad Prism v.7.0. Las variaciones de  $V_m$  y  $K_m$  de la enzima en presencia y ausencia del inhibidor, para estimar el tipo de inhibición, se compararon con un test de varianza (ANOVA) para un factor y se consideró estadísticamente significativa un valor  $p < 0,05$ . Una vez determinado el tipo de inhibición, se ajustaron las variables a las ecuaciones correspondientes al modelo correspondiente, para obtener el valor de la constante de inhibición  $K_i$ .

Ensayo de lisis de eritrocitos. Para estimar la toxicidad de los péptidos se estudió su actividad de lisis sobre glóbulos rojos humanos (GRh). Los GRh se lavaron tres veces con solución fisiológica comercial. 100 $\mu$ L de diluciones seriadas de cada péptido en solución fisiológica comercial se agregaron sobre tubos Eppendorf conteniendo 100 $\mu$ L de solución

0,4% (v/v) de GR suspendidos en solución fisiológica comercial. Los tubos se incubaron por 1 h a 37°C y luego se centrifugaron a 1000xg durante 5min. Alícuotas del sobrenadante fueron transferidas a placas de microtitulación y se midió la absorbancia a 405nm. El 0 y 100% de hemólisis fueron determinados en solución fisiológica y en 1% de Triton-X 100, respectivamente. Los péptidos se evaluaron a 6 concentraciones finales (400, 200, 100, 50, 25 y 12,5  $\mu$ M) y por triplicado.

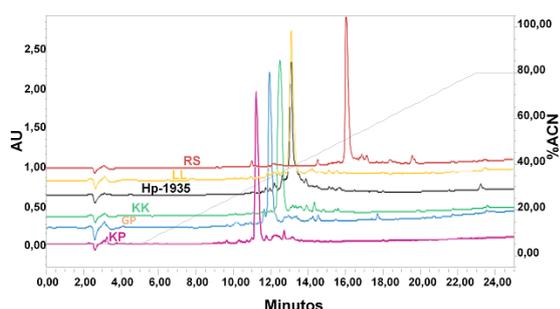
Simulación molecular. Los cálculos de *docking* flexible se realizaron con una estructura de AChE correspondiente a una forma monomérica de la acetilcolinesterasa de *Tetronarce californica* (TcAChE, PDB código 1FSS). La preparación del modelo, que consistió en la remoción de los ligandos y moléculas de agua y la adición de hidrógenos polares, se realizó con el *software* Discovery Studio Visualizer (Biovia). Para realizar los cálculos se utilizó el programa HADDOCK webserver versión Easy interface (Dominguez et al., 2003) con sus parámetros por defecto. Como residuos activos de la proteína, se seleccionaron los tres aminoácidos que conforman el sitio activo y los cinco del sitio aniónico periférico. Todos los 19 residuos del péptido Hp-1935 se seleccionaron como activos para realizar el *docking*. El modelado molecular del

péptido se realizó con el PEPFOLD3.5 (Lear y Cobb, 2016).

## Resultados y Discusión

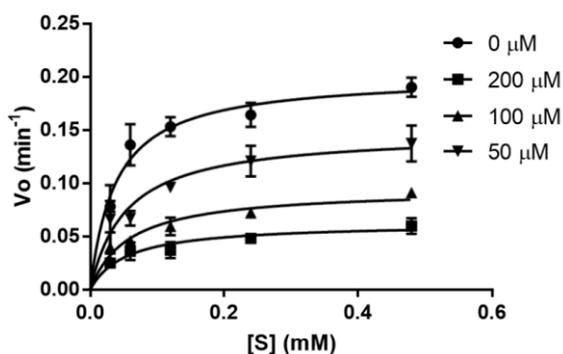
**Síntesis.** La [Figura 2](#) muestra los resultados de las corridas cromatográficas de los péptidos sintetizados.

El orden de elusión de los péptidos fue acorde a lo esperado dada la hidrofobicidad de cada secuencia. La prevalencia de un pico de absorción en cada cromatograma muestra una buena homogeneidad en los productos de síntesis.



[Figura 2.](#) Perfil cromatográfico de los péptidos sintetizados.

**Ensayo cinético del Hp-1935.** A continuación ([Figura 3](#)), se muestra la gráfica obtenida con el ensayo cinético realizado para el péptido original con la enzima AChE.



[Figura 3.](#) Estudio de la variación de la velocidad inicial de reacción ( $V_o$ ) de la enzima acetilcolinesterasa a distintas concentraciones de sustrato ( $[S]$ ) y distintas concentraciones ( $0-200 \mu\text{M}$ ) de péptido Hp-1935. Cada curva corresponde a una concentración diversa de péptido. Se muestran las barras de error correspondientes a cada punto y las que no se visualizan es por baja variabilidad de los valores obtenidos.

Las curvas de inhibición describen el comportamiento típico de un inhibidor no competitivo. Esto se deduce al evaluar la variación de los parámetros cinéticos entre la medida basal de la enzima ( $[I] = 0$ ) y las medidas realizadas en presencia de inhibidor con un test ANOVA. En la [Tabla 1](#) se muestran los valores de  $V_m$  y  $K_m$  y de  $V_m$  aparente ( $V_m \text{ app}$ ) y  $K_m$  aparente ( $K_m \text{ app}$ ) obtenidos junto con su error estándar calculados con el programa utilizado para el análisis de los datos, así como el resultado del test de varianza. En la tabla,  $V_m$  y  $K_m \text{ app}$  (aparente) corresponden a los valores de estos parámetros cuando están expuestos al inhibidor. Se resaltan los valores de  $p$  que fueron menores a  $0,05$ .

[I] ( $\mu\text{M}$ )	Parámetro (Unidad Vm: $\text{min}^{-1}$ ; Unidad Km: mM)	Error estándar	valor p (ANOVA)
0	Vm	0,2009	0,0085
	Km	0,0384	0,0065
200	Vm app	0,0622	0,0052
	Km app	0,0540	0,0160
100	Vm app	0,0945	0,0064
	Km app	0,0575	0,0125
50	Vm app	0,1476	0,0114
	Km app	0,0534	0,0149

Dado que no se observó una variación significativa de la Km y lo opuesto ocurrió con la Vm de la enzima, se concluye que el inhibidor es de tipo no competitivo, si se lo considera un inhibidor reversible. Se lo consideró de esta manera dada la naturaleza del compuesto. Una interacción entre un péptido sin aminoácidos modificados y una proteína se puede establecer mediante enlaces de tipo no covalente, a menos que se genere un puente disulfuro, que no es posible en este caso dado que los péptidos estudiados no contienen cisteínas o metioninas.

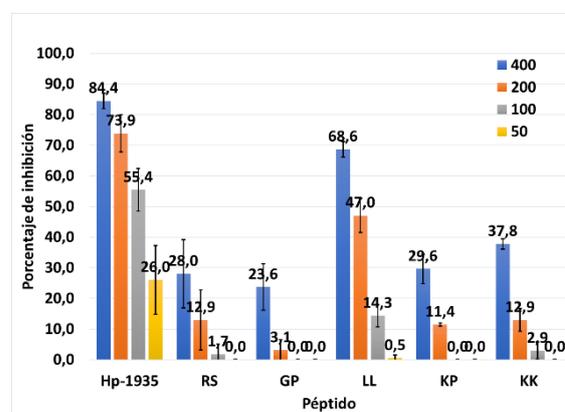
El ajuste de las variables al modelo matemático de la ecuación de Michaelis-Menten para un inhibidor no competitivo se utilizó para calcular la  $K_i$  del Hp-1935. Los resultados se muestran en la [Tabla 2](#).

Parámetro	Valor	Error estándar	Intervalo de confianza del 95%
Vmax ( $\text{min}^{-1}$ )	0,2106	0,0075	0,1961 - 0,2262
Km (mM)	0,0451	0,0054	0,0350 - 0,0575
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	<b>85,18</b>	6,48	73,7 - 99,2

El péptido Hp-1935 tiene una  $K_i$ , para la AChE de *Electrophorus electricus* con acetiltiocolina como sustrato, de  $85,18\mu\text{M}$  (73,7 - 99,2).

### Ensayos de punto final sobre el Hp-1935 y sus análogos

En la siguiente figura ([Figura 3](#)) se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos en el ensayo de punto final para el péptido Hp-1935 y los diferentes análogos sintetizados.



[Figura 3](#). Inhibición de la enzima AChE por el péptido Hp-1935 y los análogos sintetizados. Se muestra el promedio de los valores de porcentajes de inhibición obtenidos en las tres pruebas realizadas para cada concentración de péptido (400, 200, 100 y 50  $\mu\text{M}$ ). Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.

La secuencia original (Hp-1935) fue la que mayor actividad inhibitoria mostró a todas las concentraciones ensayadas. La mayor inhibición se obtuvo a 400  $\mu\text{M}$  (84,4%). La

inhibición se conservó en un 88% a la concentración de 200  $\mu\text{M}$  (73,9%), y sufrió una reducción del 34% y del 69% a las concentraciones de 100 (55,4%) y 50  $\mu\text{M}$  (26,0%), respectivamente.

Entre los análogos, el que mayor actividad inhibitoria mostró fue el LL. Este péptido, que corresponde a la región central de la secuencia original, inhibe la enzima en un 68,6 % a la concentración más alta, es decir que mantiene un 81,3% de la inhibición respecto del Hp-1935 a esa concentración, a pesar de tener 9 aminoácidos menos en su secuencia (ver [Figura 1](#)). Su actividad inhibitoria baja en un 31% a la concentración de 200  $\mu\text{M}$ , ya que genera una inhibición del 47% (contra 73,9% que produce Hp-1935). A las concentraciones de 100 y 50  $\mu\text{M}$ , su actividad disminuye en gran medida respecto el péptido original, ya que la actividad inhibitoria desciende al 14,3 y 0,5%, respectivamente.

De los análogos restantes, en orden respecto a la capacidad inhibitoria, se encuentra el análogo KK que corresponde al extremo N-terminal. A 400  $\mu\text{M}$  presentó una inhibición del 37,8%. El KP y el RS, a esa concentración, mostraron una inhibición más moderada. Se observa que todas estas regiones de la cadena original influyen en cierto grado en la inhibición. A 200  $\mu\text{M}$ , no hubo diferencias entre los análogos KK, KP y KS. El análogo GP, por su parte, fue el que menos inhibición mostró en todas las concentraciones,

sugiriendo que esta región tendría poca participación en el proceso inhibitorio.

Se observa también que, a las concentraciones menores, de 100 y 50  $\mu\text{M}$ , solamente el péptido original muestra una inhibición moderada. A 50  $\mu\text{M}$ , particularmente, todos los análogos pierden su capacidad inhibitoria.

El cálculo de la CI50, se realizó tanto para el péptido original como para el análogo LL, ya que fue el único de los análogos que mostró una inhibición mayor al 50% a 400  $\mu\text{M}$  y cercana a ese valor a 200  $\mu\text{M}$ . Se obtuvo una excelente correlación del comportamiento de las variables al utilizar el modelo logarítmico, con valores de  $R^2$  de 0,96 para el péptido Hp-1935 y 0,98 para el LL. Se calculó el péptido Hp-1935 tiene una CI50 de 99,17 $\mu\text{M}$  (81,47-120,71) y el análogo LL de 235,03 $\mu\text{M}$  (209,52 – 263,63). Por lo tanto, la CI50 del análogo tiene un valor mayor al doble que la del péptido original.

Ensayo de lisis de eritrocitos. Los resultados del ensayo de lisis de eritrocitos se muestran en la [Figura 4](#).

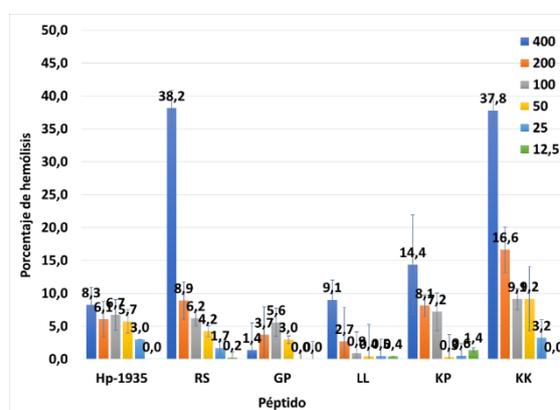


Figura 4. Resultados del ensayo de hemólisis. Se grafica el valor de hemólisis promedio obtenido con las tres lecturas realizadas para cada concentración de péptido.

A 400 $\mu$ M, los péptidos más hemolíticos fueron el RS y el KK, en torno al 40%. El KK, a 200 y 100  $\mu$ M, fue el más hemolítico de todos los análogos. Por lo tanto, se evidencia que la región N-terminal de la secuencia es la que mayor actividad hemolítica posee.

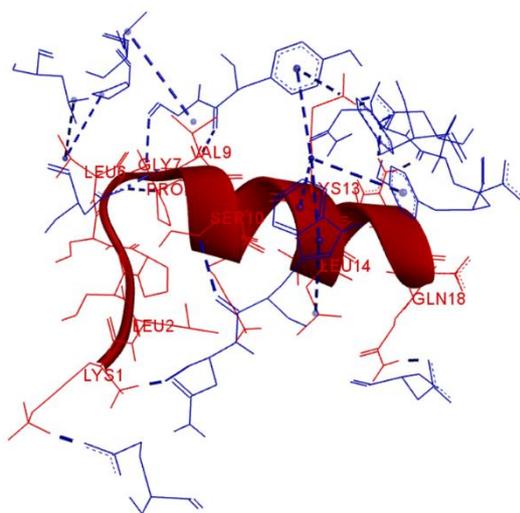
Los restantes péptidos mostraron en general bajo nivel de hemólisis. En particular, el Hp-1935 y el análogo LL no presentaron hemólisis en el rango de concentraciones ensayadas (con valores entre el 9,1% y 0%).

Simulación molecular. El programa HADDOCK encontró 4 arreglos con los cuales el péptido Hp-1935 es capaz de interactuar con la TcAChE. Como arreglo más probable se consideró al que tuvo el mejor puntaje HADDOCK, que fue -109,4 +/- 5,6. Las interacciones principales que estableció el péptido mediante esta configuración fueron con los residuos del receptor TYR 70, ASP 72, GLU 73, GLN 74, TYR 121, GLU 247, ASP 276, TRP 279, ASN 280, ASP 285, ILE 287, TYR 334, GLY 335, PRO 337 y LEU 358. Entre estos residuos se encuentran los cinco que componen el sitio aniónico periférico de la enzima o

PAS (TYR 70, ASP 72, TYR 121, TRP 279, TYR 334), por lo que se observa que el inhibidor ejerce su efecto gracias a la interacción con este sitio de la AChE. Este resultado está en concordancia con los hallazgos del ensayo cinético que muestran una actividad inhibitoria con un mecanismo de tipo no competitivo, por lo tanto, a través de un sitio diferente del sitio activo. Los otros tres *clusters* definidos por el programa también se ubican en la región del sitio PAS.

Con respecto a las interacciones encontradas por el programa, hay 10 aminoácidos del péptido que establecen alguna interacción favorable, que se muestran en la Figura 5. Algunos interactúan con más de un aminoácido de la enzima; éstos son LYS 1, LEU 6, VAL 9, LYS 13. LYS 13, en particular, establece 5 interacciones que involucran a todos los residuos aromáticos del sitio aniónico periférico (TYR 70, TYR 121, TRP 279 y TYR 334). Cuatro de estas interacciones se establecen entre la cadena alquílica de la lisina y la nube de electrones  $\pi$  de los anillos aromáticos, y la restante entre un anillo aromático y la carga del aminoácido. Los residuos del péptido que no tienen interacción con la enzima son 9: LEU 2, SER 3, PRO 4, SER 5, LYS 11, GLY 12, LEU 15, ALA 16, GLY 17. Además, hay dos residuos que establecen una interacción que es indicada por el programa como desfavorable o negativa,

que son PRO 8 (que también tiene una interacción positiva hidrofóbica) y ARG 19. Las interacciones principales favorables que se forman son 21: 10 son de tipo puente de hidrógeno, 8 de tipo hidrofóbico y 3 son electroestáticas.



**Figura 5.** Interacciones favorables entre el péptido Hp-1935 y la TcAChE, encontradas mediante el estudio de *docking*. Se muestra el péptido en color rojo, los residuos de la enzima en los que se establece interacción en azul y las interacciones con líneas discontinuas azules. Se indican también los residuos del péptido que establecen una o más interacciones positivas.

Los residuos del péptido que no tienen interacción con la enzima son 9: LEU 2, SER 3, PRO 4, SER 5, LYS 11, GLY 12, LEU 15, ALA 16, GLY 17. Además, hay dos residuos que establecen una interacción que es indicada por el programa como desfavorable o negativa,

que son PRO 8 (que también tiene una interacción positiva hidrofóbica) y ARG 19. Las interacciones principales favorables que se forman son 21: 10 son de tipo puente de hidrógeno, 8 de tipo hidrofóbico y 3 son electroestáticas.

En la siguiente tabla **Tabla 3** se muestra como las interacciones (de cada tipo, favorables y desfavorables) se distribuyen en la secuencia del Hp-1935 correspondiente a cada análogo sintetizado. Se observa que el mayor número de interacciones ocurre en la región central del péptido, debido al aumento de atracciones de tipo hidrofóbico. El análogo con mayor capacidad inhibitoria, el LL, corresponde a esta región, en la cual se mantienen 17 de las 21 interacciones totales del péptido. Respecto del análogo KP, que tiene una sola interacción total menos, tiene un residuo de leucina (LEU 14) que establece una atracción hidrofóbica con el residuo TRP 279 del sitio aniónico periférico. Este residuo se ubica en el centro del sitio PAS y es considerado el más importante (Masson et al., 1997), por lo que la mayor capacidad de interactuar con él que tiene la secuencia del análogo LL puede explicar su mejor poder inhibitorio.

Tabla 3

Residuos péptido Hp-1935	Análogo correspondiente	Número de interacciones	Tipo de interacción			
			PH	HF	ELEC	NEG
1-11	KK	11	6	3	1	1
4-13	KP	16	6	7	2	1
6-15	LL	17	6	8	2	1
8-17	GP	14	5	6	2	1
10-19	RS	13	5	5	2	1

PH: interacción de puente hidrógeno; HF: hidrofóbica; ELEC: electronegativa; NEG: interacción desfavorable

## Conclusiones

El péptido Hp-1935 mostró una considerable actividad inhibitoria sobre la AChE. Si bien se aisló como inhibidor de la butirilcolinesterasa a partir de la piel de *Hypsiboas pulchellus* (rana de zarzal), había mostrado una inhibición más moderada con esa enzima. Los resultados obtenidos lo proponen como un mejor candidato como inhibidor de AChE. La  $CI_{50}$  del péptido es  $99,17 \mu M$  ( $81,47 - 120,71$ ) y su  $K_i$   $85,18 \mu M$  ( $73,7 - 99,2$ ). Estos valores son al menos unas 50 veces mayores a los reportados para algunos inhibidores en uso para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer, como la galantamina ( $K_i$  de  $1,56 \mu M$ ) (Pietsch y Gutschow, 2005), pero dada la poca bibliografía que reporta péptidos inhibidores de las colinesterasas, se considera un buen modelo de partida. Analizando los resultados obtenidos, se considera que la estrategia de diseño de los análogos fue eficiente en cuanto permitió determinar que una región específica tiene un potencial inhibitorio mucho mayor que las restantes. Por lo tanto, el esquema de diseño empleado en este trabajo podrá ser utilizado para la construcción de nuevos análogos, variando longitud e intervalos de desplazamiento en la secuencia para delimitar con mayor precisión la fracción inhibitoria.

Con respecto al sitio de acción del péptido Hp-1935, se encontró que la inhibición ocurre mediante un mecanismo de tipo no competitivo y, mediante los cálculos de *docking* flexible, se encontró que el lugar de acción del compuesto es el sitio aniónico periférico de la enzima o sitio PAS. Este hallazgo despierta nuevos intereses sobre el potencial del péptido y sus derivados como candidatos en la búsqueda de compuestos para el tratamiento de la EA. El sitio PAS representa hoy en día la principal diana terapéutica de la investigación farmacológica dedicada a esta patología (Pohanka, 2011). Su acción fisiológica involucra tanto al proceso catalítico como procesos no catalíticos, principalmente la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide que genera la formación de las placas seniles. Las dos principales hipótesis que se han formulado sobre los daños cerebrales ocasionados por la EA, las hipótesis colinérgica y amiloidea, tienen como punto de conjunción el sitio aniónico periférico de la colinesterasa. El análisis de las características de este sitio, en particular su composición aminoacídica, dominada por residuos aromáticos, va a orientar las modificaciones que se introduzcan en las nuevas secuencias de análogos que se generen.

El ensayo de hemólisis, por su parte, permitió estimar el potencial citotóxico de los péptidos. Sus resultados son alentadores respecto a los dos péptidos

con mayor inhibición, el Hp-1935 y su análogo LL, que resultaron poco hemolíticos generando menos de un 10% de hemólisis a la concentración más elevada.

Los hallazgos de este estudio permitirán orientar con eficiencia el diseño de nuevos análogos. Los estudios de *docking* ponen en evidencia como las interacciones de tipo hidrofóbico son las que permiten al péptido actuar sobre los residuos principales del sitio aniónico periférico, como TYR 70, TYR121 y TRP 279. Se destacó en este sentido la acción de la cadena cíclica de un residuo de prolina (PRO 8) y la de la cadena alquílica de una lisina (LYS 13). Por lo tanto, un enfoque interesante que se tendrá en cuenta para nuevas modificaciones es la introducción de aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos. Muchos de los inhibidores del sitio PAS reportados, como el propidio y la huperzina A, tienen justamente anillos aromáticos. Además, la introducción de residuos de este tipo podría contribuir paralelamente a mejorar la actividad antioxidante. Se debe tener en cuenta, de todas formas, que esos aminoácidos tienden a potenciar la capacidad hemolítica.

Un candidato promisorio sobre el cual se pueden generar análogos es el péptido LL, dado que su secuencia es mucho más corta que la del original y conserva buena parte de su inhibición, al menos a altas concentraciones.

Estos resultados proponen al Hp-1935 y al péptido correspondiente a su región central como buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la EA.

## Bibliografía

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.*, 14 September 2011.

Dominguez C, Boelens R and Alexandre MJJ, 2003. Bonvin. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1731-1737.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.Jr.; Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Johnson G y Moore SW, 2006. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Curr Pharm Des.* 2006;12(2):217-25.

Lear S, Cobb SL, 2016. Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral

peak assignment. *J Comput Aided Mol Des.* 2016 Mar;30(3):271-7.

Masson P et al., 1997. Importance of aspartate-70 in organophosphate inhibition, oxime re-activation and aging of human butyrylcholinesterase. *Biochem. J.* 325, 53-61.

Murphy MP y LeVine H III, 2010. Alzheimer's Disease and the  $\beta$ -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis.* 2010 Jan; 19(1): 311.

Rahman A y Choudhary M, 2015. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease 1st Edition.* Bentham Science Publishers.

Rodriguez-Ithurralde et al., 1983. Fasciculín, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Neurochem Int.* 1983;5(3):267-74.

Siano et al., 2014. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J Nat Prod.* 2014 Apr 25;77(4):831-41. doi: 10.1021/np4009317

Siano et al., 2017. Molecular Design and Synthesis of Novel Peptides from amphibian's skin Acting as Inhibitors of Cholinesterase Enzymes. *Journal of Peptide Science.* DOI: 10.1002/psc.2974

Pietsch M, Gutschow M, 2005. Synthesis of Tricyclic 1,3-Oxazin-4-ones and Kinetic Analysis of Cholesterol Esterase and Acetylcholinesterase Inhibition. *J Med Chem.* 2005 Dec 29;48(26):8270-88.

Pohanka M, 2011.

CHOLINESTERASES, A TARGET OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Sep; 155(3):219–230.

WHO, 2017. Demencia. Nota descriptiva.

[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/)