

Actividad antiamiloidogénica *in vitro* de 3-aminocumarina y 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina

Raquel Asperilla Martín. Amaia Fernández Uriarte.

Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
rasperilla@ucm.es

Paloma Bermejo Bescós. Sagrario Martín-Aragón.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid
bescos@ucm.es, smartina@ucm.es

Resumen: el desarrollo de fármacos con potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer es uno de los objetivos principales en terapéutica, ya que la enfermedad constituye un grave problema sociosanitario a nivel mundial. Parece ser que una parte importante de la patogenia de la enfermedad está relacionada con el estrés oxidativo, frente al cual estudios anteriores revelan que las cumarinas, compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, son activas por su capacidad neuroprotectora. Por este motivo, en el presente estudio probamos la eficacia de dos cumarinas (3-aminocumarina y fraxetol) en diferentes dianas del proceso amiloidogénico. Nuestros estudios ponen de manifiesto que 3-aminocumarina y 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina poseen propiedades antiamiloidogénicas, ya que son activos como inhibidores de β -secretasa, moduladoras de γ -secretasa, inhibidores de la agregación y desagregantes del péptido β -amiloide 25-35.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer. Cumarinas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo cuyo principal signo es la pérdida progresiva de memoria. Es una de las causas más frecuentes de demencia y con mayor incidencia entre la población de más de 80 años (el 50%) y en la franja de 65 a 80 años (el 15%). En España, se estima que el número de enfermos de Alzheimer puede rondar las 400.000 personas, lo cual implica que esta enfermedad tiene connotaciones sociológicas y biosanitarias. Al ser una enfermedad de etiopatología desconocida, es objeto de numerosos estudios, enfocados desde distintos puntos de vista, fisiopatológico y farmacológico como el que nos compete a nosotros. A nivel cerebral, los signos que la caracterizan son la formación de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, y la muerte neuronal. La memantina y los inhibidores

de la acetilcolinesterasa son los fármacos que se están utilizando en la terapéutica actualmente, sin embargo, su única función es retrasar la enfermedad. Por ello es tan importante la búsqueda de nuevas sustancias que nos ayuden a comprender la etiopatología y que puedan además, convertirse en futuros fármacos útiles en clínica.

Las placas de amiloide son acúmulos del péptido beta-amiloide de 42 aminoácidos (β A1-42), que proviene del procesamiento del APP por la vía amiloidogénica, en la que intervienen la β y la γ -secretasas. Si en lugar de actuar la β -secretasa actúa la α -secretasa, el APP se procesa por la vía no amiloidogénica dando lugar a un péptido de 40 aminoácidos con carácter neuroprotector. Por otro lado, los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares de proteína tau hiperfosforilada por acción de GSK3 y cdk-5. La proteína tau forma parte del citoesqueleto neuronal si se mantiene defosforilada, acción permitida por la apolipoproteína E3. Se ha visto que existe mayor prevalencia de la enfermedad entre las personas con la isoforma E4 de la proteína.

La neurodegeneración empieza en la corteza entorrinal extendiéndose después a otras regiones del cerebro, particularmente al hipocampo y las regiones parietal y temporal del neocortex, afectando a los sistemas catecolaminérgicos, serotoninérgicos y principalmente colinérgicos. En la actualidad la búsqueda de fármacos para el tratamiento de esta enfermedad está basada en numerosas dianas como la inhibición de la β -secretasa, modulación de la γ -secretasa, desagregación de β A1-42 o inhibición de su agregación, e inhibición de los enzimas responsables de la degradación de neurotransmisores implicados.

Las cumarinas son un grupo de sustancias fenólicas ampliamente distribuidas en la naturaleza que presentan numerosas actividades farmacológicas como: antiinflamatoria, antitumoral hepatoprotectora, anti-HIV-1, antiviral, antioxidante, etc ⁽¹⁾. Estudios recientes han demostrado el efecto neuroprotector de estas sustancias al inhibir las especies reactivas de oxígeno (ROS) y presentar una acción anti-apoptótica ⁽²⁾. Además, diversas cumarinas han mostrado actividad inhibitoria de la agregación del péptido β -amiloide ⁽³⁾.

En el presente trabajo se ha estudiado la actividad antiamiloidogénica *in vitro* de dos cumarinas (3-aminocumarina y 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina) mediante la determinación de actividad inhibitoria de β -secretasa y γ -secretasa, así como su efecto en el proceso de fibrillogénesis del péptido β -amiloide.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cumarinas en estudio (Fig. 1)

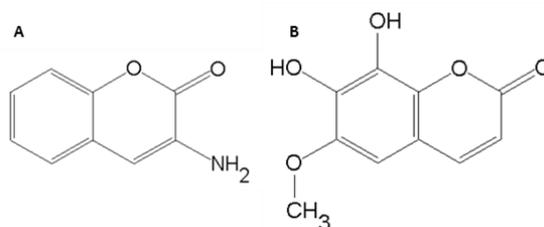


Figura 1. Estructura de las cumarinas en estudio. A: 3-aminocumarina (Cum1); B: 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina (Cum2).

Viabilidad celular

La viabilidad de las células HEK tras el tratamiento con los compuestos en estudio se determinó mediante la reducción del MTT ó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio a formazán, a partir de las deshidrogenasas mitocondriales (Mosmann, 1983). Se procede con la siembra de 20000 células/ pocillo (en 100 μ l de medio de cultivo con 10% suero bovino fetal) en placas estériles de 96 pocillos. La placa se mantiene en incubador (37°C, 5% CO₂) durante 24 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se añaden a las células los compuestos en estudio, disueltos en el medio de cultivo (1% de suero bovino fetal), y se mantienen durante un periodo de 24 horas. A continuación, se determina la viabilidad celular mediante la cuantificación de la respiración mitocondrial.

Tras las 24 horas de tratamiento se elimina el medio de cultivo y se adicionan 100 μ l del medio de cultivo (1% de suero bovino fetal) más 20 μ l de MTT estéril (2 mg/ml en tampón PBS) por pocillo. Se incuba la placa 1 hora a 37°C, posteriormente se elimina el medio y se añaden 100 μ l de DMSO a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán. La producción de formazán se mide espectrofotométricamente con un lector de placas a $\lambda = 550$ nm.

Actividad β -secretasa

El ensayo de actividad, que se utiliza para la detección de potenciales inhibidores de β -secretasa, se basa en la escisión de un péptido específico de β -secretasa conjugado con una molécula fluorescente y con DABCYL, para dar lugar finalmente a una señal fluorescente. El nivel de actividad enzimática secretasa es proporcional a la reacción fluorimétrica. El ensayo se llevó a cabo a 25°C utilizando 0,24 U de β -secretasa humana recombinante y un sustrato fluorogénico a 10 μ M en tampón de acetato sódico (20 mM, pH 4,5), en un volumen final de 100 μ l. La fluorescencia se midió utilizando un lector de fluorescencia de placas. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 360 y 528 nm, respectivamente.

Actividad γ -secretasa

Células HEK-tau son lisadas con tampón de lisis que contiene 20 mM MES pH 6.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 μ g/ml leupeptin, 0,2 mM PMSF, and 1 μ g/ml pepstatin A, 2 μ g/ml aprotinin y 0,5% Triton X-100. Los lisados celulares se centrifugan a 800 g durante 10 min a 4°C. A continuación se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 2100 g durante 1 hora a 4°C. El pellet resultante se resuspende en 125 μ l de tampón de lisis que contiene 2% de CHAPS. Se determina la concentración de proteínas y se lleva a cabo el ensayo mediante la incubación de un volumen de pellet equivalente a 15-20 μ g de proteína con el sustrato fluorogénico NMA-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Lys(DNP)-D-Arg-D-Arg-D-Arg-NH₂ (Calbiochem) a concentración de 8 μ M, en ausencia y en presencia del compuesto en estudio a 10 μ M, a 37°C y durante 2 horas. La hidrólisis del sustrato resulta en un incremento de la fluorescencia (excitación máx 355 nm; emisión máx 440 nm).

Fibrillogénesis del péptido β -amiloide

Esta técnica permite cuantificar la inhibición de la agregación y el efecto desagregante del péptido β -amiloide. El fundamento de la técnica consiste en que la tioflavina T se intercala entre los agregados del β -amiloide, produciendo un compuesto fluorescente proporcional a la cantidad de agregado.

El fragmento 25-35 de β -amiloide se prepara a una concentración de 1 mM (en PBS, pH = 7,4). Para estudiar la posible inhibición de la agregación del β -amiloide por parte de los compuestos en estudio, se utiliza a una concentración final de β -amiloide de 50 μ M en un volumen final de 100 μ l. Se añaden los compuestos en estudio a una concentración final de 10 μ M y 1 μ M, y la mezcla se incuba durante 3 días a 37°C. Para cuantificar el grado de agregación del β -amiloide se toman 25 μ l de la mezcla y se añaden 125 μ l de tioflavina T (Concentración final de 25 μ M), cuantificándose la fluorescencia (λ_{exc} = 446 nm; λ_{em} = 482 nm).

Para estudiar el posible efecto desagregante del β -amiloide por parte de los compuestos en estudio, se realizan los mismos procedimientos anteriores, a excepción de que los compuestos en estudio se adicionan al β -amiloide una vez que se han formado los agregados (al tercer día), midiéndose la fluorescencia 48 horas después.

RESULTADOS

En primer lugar, se determinó la toxicidad de las cumarinas en estudio. Ninguna de las cumarinas mostró una toxicidad significativa en la línea celular HEK a la concentración de 10 μ M tras 24 h de tratamiento. Por ello, esta fue la concentración máxima utilizada para evaluar la actividad antiamiloidogénica.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se recogen en la Tabla 1.

	% Inhibición β -secretasa	% Inhibición γ -secretasa	% Inhibición agregación β 25-35	% Desagregación β 25-35
Cum 1				
10 μ M	100,0	46,31	38,6	16,7
1 μ M	0,0	---	23,1	13,3
Cum 2				
10 μ M	65,1	38,36	54,2	23,0
1 μ M	7,6	---	7,0	17,7

Cum 1 = 3-aminocumarina; Cum 2 = 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina

Tabla 1. Actividad antiamiloidogénica *in vitro* de 3-aminocumarina y 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina.

Los estudios realizados *in vitro* demuestran que los compuestos ensayados presentan actividad en las diferentes dianas ensayadas y además no resultan ser tóxicos para las células.

En relación a los enzimas encargados del procesamiento del β -amiloide, en los ensayos realizados *in vitro* se puede observar que ambas moléculas tienen actividad como inhibidores tanto de β como de γ -secretasa. En el caso de γ -secretasa, el porcentaje de inhibición no es muy elevado lo que indica que no se está produciendo una inhibición del enzima sino su modulación, puesto que, como ya se ha dicho anteriormente, también se encarga del procesamiento del APP por la vía no amiloidogénica.

En cuanto al β -amiloide 25-35, los estudios realizados sobre el proceso de fibrillogénesis, demuestran que las cumarinas estudiadas se comportan mejor como inhibidoras de la agregación que como desagregantes del péptido β -amiloide una vez agregado.

DISCUSIÓN

Habida cuenta que el desarrollo de nuevos fármacos multidiana eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer requieren actividad frente a varias de las dianas terapéuticas más importantes responsables de esta patología, nuestros estudios ponen de manifiesto que 3-aminocumarina y 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina poseen propiedades antiamiloidogénicas, ya que son activos como inhibidores de la β -secretasa, moduladoras de la γ -secretasa, inhibidores de la agregación y desagregantes del péptido β -amiloide 25-35. Sin embargo se trata de estudios preliminares, sobre los que se debería profundizar para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anand P, Singh B, Singh N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012;20(3):1175-1180.
2. Sánchez-Reus M I, Iglesias Peinado I, Molina-Jiménez M F, Benedí J. Fraxetin prevents rotenone-induced apoptosis by induction of endogenous glutathione in human neuroblastoma cells. *Neuroscience Research*. 2005; 53(1):48-56.
3. Soto-Ortega D D, Murphy B P, Gonzalez-Velasquez F J, Wilson K A, Xie F, Wang Q, Moss M A. Inhibition of amyloid- β aggregation by coumarin analogs can be manipulated by functionalization of the aromatic center. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011; 19(8):2596-2602.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.