



**ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE
15-LIPOXIGENASA DE SOYA POR UNA SERIE
DE BENCIL FENIL CETONAS
POLIHIDROXILADAS**

Gianina Toledo Valdés

Profesor tutor: *Dra. Carolina Mascayano C.*

Profesor cotutor: *Dra. Victoria Espinosa*

Comisión evaluadora: *Dra. Milena Cotorás
Dra. Leonor Contreras*

Resumen

Las lipoxigenasas (Lox) son una familia de enzimas que contienen hierro no hémico y que catalizan la dioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados, dando como producto hidroxiperóxidos de ácidos grasos [1]. Su sustrato natural es el ácido linoleico, para las Lox de origen vegetal, o ácido araquidónico, para las de origen animal. El ácido araquidónico se obtiene de la dieta y se encuentra esterificado como componente de fosfolípidos de membrana. Las Lox son nombradas de acuerdo a la posición específica en que oxigenan el ácido araquidónico, encontrándose así las isoformas 5-, 12- y 15-lipoxigenasas [2].

La estructura de esta enzima es una sola cadena polipeptídica, con un dominio N-terminal del tipo barril- β y un dominio catalítico mayormente formado por hélices, donde se encuentra el hierro. El hierro no-hémico presente en el sitio activo cumple un rol importante en la catálisis de la reacción, debido a que pasa de estado de oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+} cuando la enzima se encuentra activa [3]. El metal se encuentra coordinado dentro del sitio activo por tres residuos de His, una Ile, una molécula de H_2O , y un residuo que varía entre His/Asn/Ser dependiendo del organismo en que se encuentra [4].

Las lipoxigenasas han sido ampliamente estudiadas debido a su participación en la respuesta inflamatoria, ya que los productos de su reacción dan lugar a la formación de leucotrienos, lipoxinas, prostaglandinas y tromboxanos [5]. Estas moléculas conocidas como eicosanoides, constituyen una red muy compleja de señalización celular, participando en los procesos inflamatorios, tanto en su origen como en su resolución, y en la respuesta inmune [6]. Por otra parte, se ha descrito que las lipoxigenasas participan en diversas enfermedades tales como asma [7], aterosclerosis [8], alzheimer [9], artritis [10] y algunos tipos de cáncer como: colorrectal, prostático, de mamas, y pulmonar [11]. Es por ello que la búsqueda de inhibidores específicos para estas enzimas se ha transformado en un foco interesante de investigación. Existen estudios que demuestran que los flavonoides e isoflavonoides son buenos inhibidores para las lipoxigenasas [12, 13]. Sin embargo, este desafío no es fácil, ya que las isoformas de estas enzimas

no solo son específicas en la posición que oxigenan, sino que también entre las especies, tejidos, y células en las que se encuentran, lo que las vuelve un blanco difícil para el diseño de inhibidores.

Por otra parte, es importante realizar estudios estructurales que permitan establecer las principales interacciones que se dan entre los residuos aminoacídicos y los distintos inhibidores, ya que así se pueden realizar mejoras en el diseño de estos. Una herramienta útil para este propósito es el acoplamiento molecular o “docking”.

En este trabajo se utilizarán una serie de bencil fenil cetonas, previamente sintetizadas, las cuales son precursores de isoflavonas, para estudiar su capacidad de inhibir la 15-lipoxigenasa de soya.

Hipótesis

“La presencia de grupos hidroxilos, aromáticos, y el efecto de diferentes sustituyentes en las bencil fenil cetonas, cumplen un rol clave en la unión y consecuente inhibición de 15-lipoxigenasa de soya”.

Objetivos

Para demostrar esta hipótesis se plantea el siguiente objetivo general: “Determinar el IC₅₀ por medio de ensayos enzimáticos espectrofotométricos y posterior acoplamiento molecular de una serie de derivados sintéticos de bencil fenil cetonas frente a 15-lipoxigenasa de soya”.

Los objetivos específicos que se deben realizar para alcanzar este objetivo general son:

- 1- Realizar una evaluación preliminar de una serie de derivados polihidroxilados frente a 15-LOX de soya.
- 2- Determinar los valores de IC₅₀ para aquellos compuestos que presenten mayor porcentaje de inhibición frente a 15-LOX.
- 3- Realizar un estudio de cinética enzimática para el mejor inhibidor encontrado.

- 4- Evaluar la capacidad antioxidante de los mejores inhibidores a través del método DPPH
- 5- Realizar un ensayo de pseudoperoxidasa para conocer si el mejor inhibidor afecta el estado de oxidación del hierro dentro del sitio activo.
- 6- Realizar acoplamiento molecular o “docking” de los compuestos frente a la estructura cristalina de la enzima.

Metodología

1- Evaluación in vitro de una serie de derivados de bencil fenil cetonas frente a 15-lipoxigenasa de soya.

Las reacciones para medir actividad enzimática fueron realizadas en un medio que contiene Hepes 25mM a pH 7.4, con 0,01% Tritón X-100, y ácido araquidónico como sustrato (10 μ M). La reacción se inició al agregar la enzima 15-lipoxigenasa de soya a una cubeta que contiene tanto el buffer como el inhibidor disuelto en DMSO. Es importante mencionar que la reacción debe realizarse en agitación constante, utilizando una barra magnética. La variación de la absorbancia en el tiempo, siguiendo la formación del producto de reacción, fue medida en un espectrofotómetro UV Perkin-Elmer a 234nm a temperatura ambiente.

Los ensayos de IC₅₀ se realizaron utilizando distintas concentraciones del inhibidor dentro del rango de velocidad inicial. El ensayo de cinética enzimática para determinar el mecanismo de inhibición fue realizado para el mejor inhibidor encontrado, utilizando distintas concentraciones de inhibidor y de sustrato. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a distintos días.

2- Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH

Para evaluar la capacidad antioxidante se disolvió el compuesto de interés en metanol, y se le agregó 1 ml de DPPH 0,1 mM disuelto en metanol. La reacción se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Se

registró la absorbancia a 517nm, y la capacidad antioxidante fue calculada utilizando una curva estándar de ácido ascórbico.

3- Evaluación de actividad pseudoperoxidasa.

Para determinar si el inhibidor posee actividad pseudoperoxidasa, se midió espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 234 nm. Se utilizó un medio que contenía buffer fosfato pH:7,4, el producto de reacción 13-HPODE (μM), la enzima y el inhibidor disuelto en DMSO.

4- Acoplamiento molecular de una serie de derivados de bencil fenil cetonas frente a la estructura cristalina de 15-lipoxigenasa de soya.

El acoplamiento molecular se realizó utilizando los derivados polihidroxiados de bencil fenil cetonas, y la estructura cristalina de la enzima (PDB ID:1N8Q), utilizando el algoritmo Lamarckiano y flexibilidad completa de los ligandos, todo lo anterior fue llevado a cabo en el programa AutoDock4, además las cargas parciales derivadas del potencial electrostático de cada ligando se obtuvieron mediante el programa Gaussian03.

Resultados

Al realizar el screening de toda la serie de moléculas a estudiar, se obtuvieron los porcentajes de inhibición de cada una de ellas, encontrándose que las 2 moléculas con mayores porcentajes de inhibición corresponden a la K212 (40% de inhibición) y K418 (62% de inhibición). Luego se obtuvo el valor IC_{50} para ambas moléculas, siendo 17,48 μM para K212, y 8,47 μM para K418, por lo tanto esta última molécula corresponde al mejor inhibidor encontrado. Al realizar el estudio de cinética enzimática para el mejor inhibidor, se obtuvo el gráfico de dobles recíprocos, el cual dio un comportamiento del tipo no competitivo para la molécula k418. También se encontró que esta molécula no posee capacidad antioxidante, ni actividad pseudoperoxidasa, y en concordancia con los resultados anteriormente nombrados, al realizar el docking se observa que el inhibidor no se une al sitio activo de la enzima, sino que se ubica a la entrada de la cavidad.

Referencias

- [1] V. Chedea et al. Biochemical Testing, InTech (2012) pp. 151e178.
- [2] I. Ivanov, D. Heydeck , K. Hofheinz , J. Roffeis ,V. O'Donnell, H. Kuhn, M. Walther. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 503:161–174
- [3] Alan R Brash (1999) Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679-23682
- [4] R. Jurgen K, R. WIESNER, J. RATHMAN, G. VELDINK, H. NOLTING, V. A. SOLE; H. KUHN. (1998). The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases *Biochem. J.* 332, 237-242
- [5] Ch. D. Buckley, D. W. Gilroy, and Ch. N. Serhan.(2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* 40, 315-327
- [6] C. Serhan, S. Yacoubian, R. Yang. (2008). Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 279-312
- [7] Holtzman MJ.(1992). Arachidonic Acid Metabolism In Airway Epithelial Cells. *Annu Rev Physiol* 54, 303–329
- [8] Kühn H, I. Römisch, J. Belkner. (2005). The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis, *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 1014–1029
- [9] P.F. Giannopoulos, Yash B. Joshi, Jin Chu, D. Pratico. (2013). The 12-15-lipoxygenase is a modulator of Alzheimer's-related tau pathology in vivo. *Aging Cell* 12, 1082–1090
- [10] Krönke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtysek C, Schabbauer G, Zarbock A, Koenders MI, Axmann R, Zwerina J, Baenckler HW, van den Berg W, Voll RE, Kühn H, Joosten LA, Schett G. (2009) 12/15-Lipoxygenase Counteracts Inflammation and Tissue Damage in Arthritis. *The Journal of Immunology* 183, 3383–3389
- [11] Adi J. Klil-Drori, A. Ariel. (2013). 15-Lipoxygenases in cancer: A double-edged sword? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 106, 16–22
- [12] Rai G, Joshi N, Jung JE, Liu Y, Schultz L, Yasgar A, Perry S, Diaz G, Zhang Q, Kenyon V, Jadhav A, Simeonov A, Lo EH, van Leyen K, Maloney DJ, Holman

TR. (2014). Potent and Selective Inhibitors of Human Reticulocyte 12/15-Lipoxygenase as Anti-Stroke Therapies *J. Med. Chem.* 57, 4035–4048

[13] Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM, Silva AM, Porto G, Cabrita EJ, Marques MM, Fernandes E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study. *European J. Med. Chem.* 72, 137–145