



Fundació
La Marató de TV3

XVII SIMPOSIUM

Lesiones medulares y cerebrales adquiridas



ESFINGOLÍPIDOS COMO DIANA PARA LA RECUPERACIÓN DE LAS LESIONES DE LA MÉDULA ESPINAL: EL PAPEL DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO

Josefina Casas Brugulat

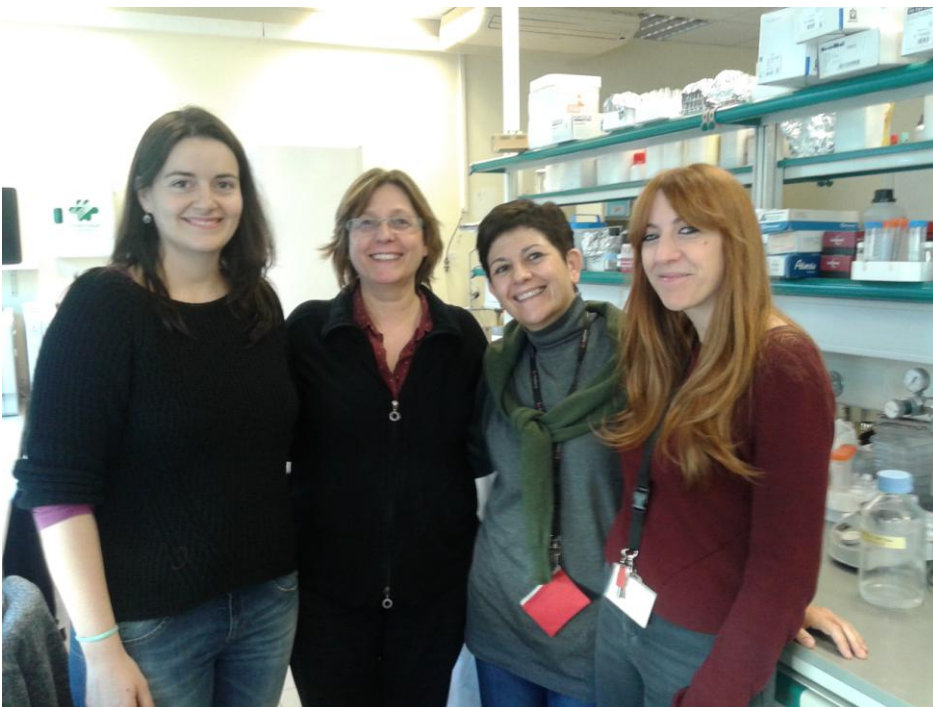
Institut de Química Avançada de Catalunya CSIC

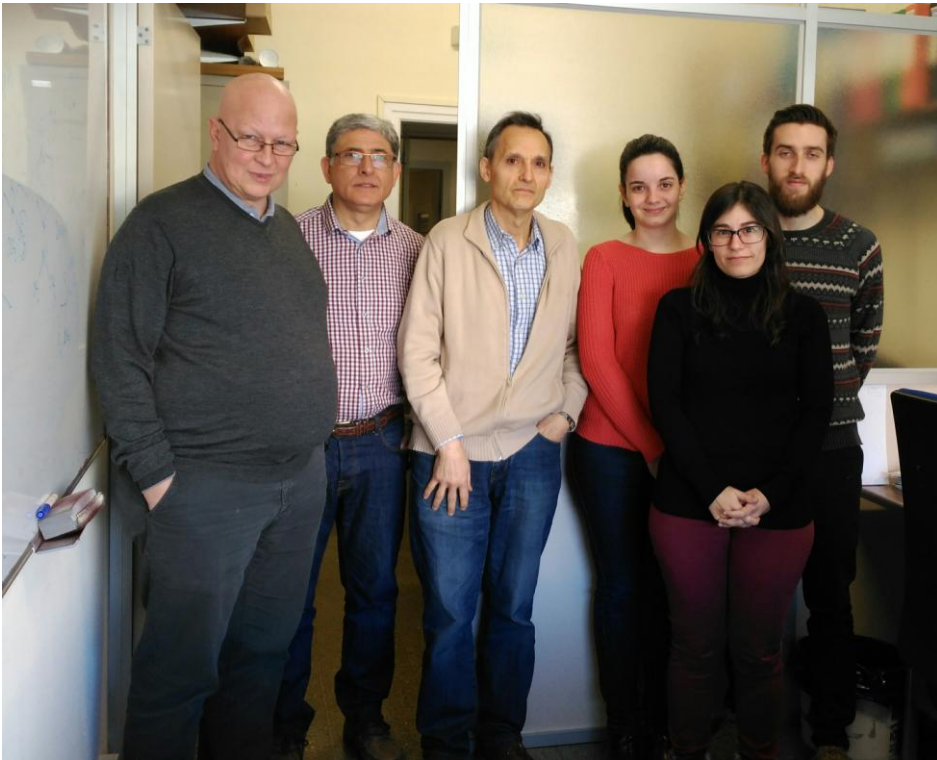
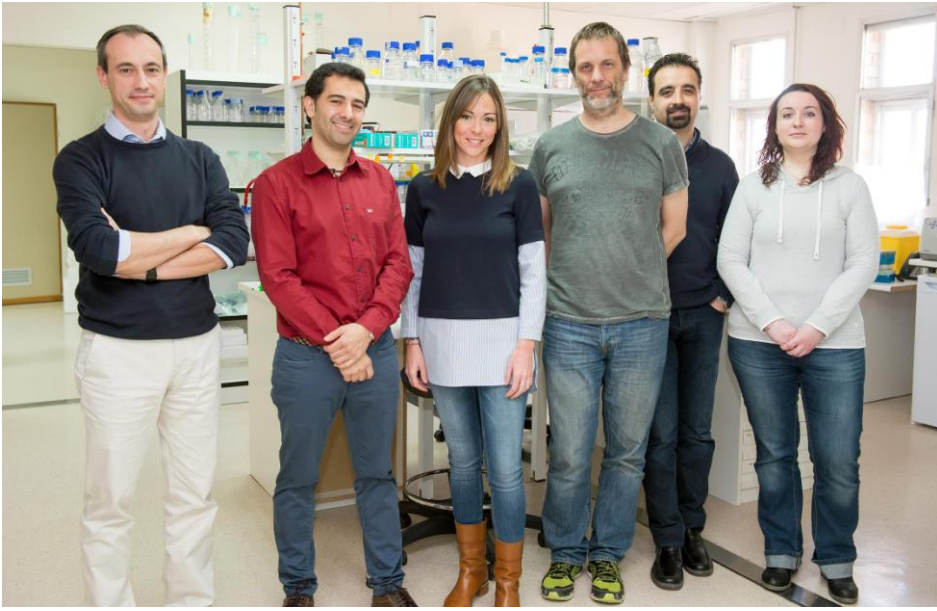
Rodrigo Martínez Maza

Hospital Nacional de Paraplégicos. Toledo

Antonio Delgado Cirilo

Facultat de Farmàcia UB





1. Resumen

Evidencias acumuladas indican que la *D-eritro*-esfingosina-1-fosfato (S1P) modula procesos que ocurren después de la lesión (muerte celular por apoptosis, hidrólisis de lípidos, estrés oxidativo, daño tisular), y favorece el crecimiento y las actividades tróficas, la angiogénesis y la neurogénesis. Así, el descubrimiento de nuevas terapias neuroprotectoras de la lesión de la médula espinal (LME) puede surgir de las intervenciones sobre el metabolismo de la S1P. S1P es irreversiblemente degradado por la enzima liasa S1P (SPL). Por lo tanto, SPL es un objetivo neurorestaurador atractivo, dado que su inhibición aumentará los niveles de S1P.

Basándonos en las estructuras de rayos X de SPL descritas, se han diseñado y sintetizado tres generaciones de inhibidores de la enzima y se han ensayado mediante métodos HTS que se han puesto a punto en este proyecto. Los compuestos de tercera generación obtenidos en el proyecto, debidamente administrados, podrían causar incrementos significativos de S1P en el lugar de la lesión. Por otra parte, los resultados de la caracterización de la vía esfingosina-S1P-receptores S1PR, tras la lesión medular, indican que la concentración de S1P es modulada por la concentración y actividad de la SPL y no depende de otras enzimas como quinasas o fosfatasas. En consecuencia, la modulación de la actividad de esta enzima es una buena estrategia para controlar la concentración de S1P en la lesión medular.

2. Resultados

El objetivo general de esta propuesta era demostrar que la modulación química de la actividad SPL podría servir de base para futuras intervenciones farmacológicas para mejorar la funcionalidad del sistema nervioso dañado.

Se ha visto que después de la lesión experimental de la médula espinal (ME), las alteraciones en los esfingolípidos de este órgano se producen principalmente a nivel de la esfingosina (So) y, especialmente, la S1P. El cambio más importante ocurre el tercer día después de la lesión, cuando la relación S1P/So disminuye en comparación con otros puntos de tiempo (figura 1).

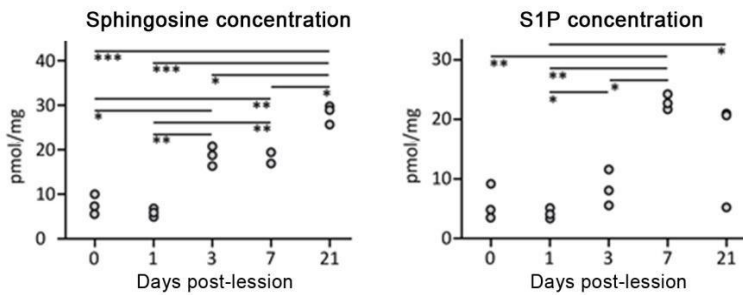


Figura 1. Concentraciones de esfingosina y de S1P en la médula espinal de ratones en diferentes momentos después de la lesión determinadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

Para comprender los mecanismos implicados en los cambios en la relación S1P/So el tercer día posterior a la lesión, se midieron los niveles de las enzimas implicadas en el metabolismo de la S1P. El análisis por *Western blot* mostró que la SPL experimentó la alteración principal (figura 2A). Los niveles de enzima aumentaron el día 1, a partir del cual se observó una disminución gradual en función del tiempo hasta el día 7. Por otra parte, tal como se muestra en la figura 2B, el mRNA de la SPL disminuyó respecto al control al cabo de un día de la lesión, en desacuerdo con los cambios observados en los niveles de proteína. De acuerdo con las medidas de proteína, el mRNA experimentó una disminución temporal a lo largo del tiempo posterior a la lesión. Estos resultados sugieren que los incrementos de proteína observados después de la lesión son probablemente debido a una inhibición de su degradación. Otras enzimas del metabolismo de la S1P no se vieron afectadas significativamente (datos no presentados).

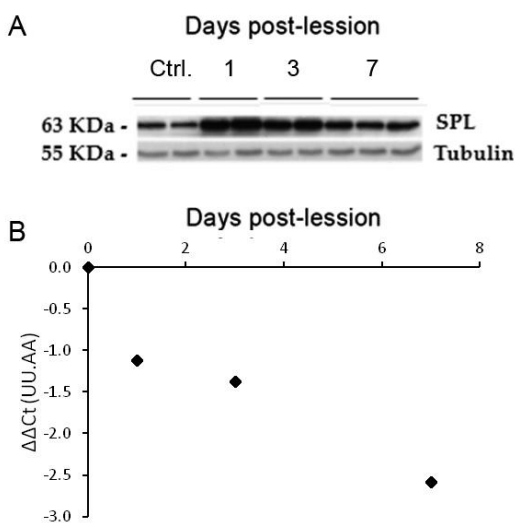


Figura 2. Niveles de SPL determinados mediante *Western blot* (A) y niveles de mRNA de SPL medidos por qPCR en diferentes momentos después de la lesión medular. Los datos se obtuvieron de 2-3 repeticiones.

Para evaluar más a fondo el presumible papel del eje S1P/SPL, se hicieron experimentos en animales heterocigotos deficientes en SPL (SPL +/-). Resulta interesante que estos animales recuperaran la función motora después de la lesión, mientras que los animales silvestres (*wild type*) no experimentaron recuperación (figura 3).

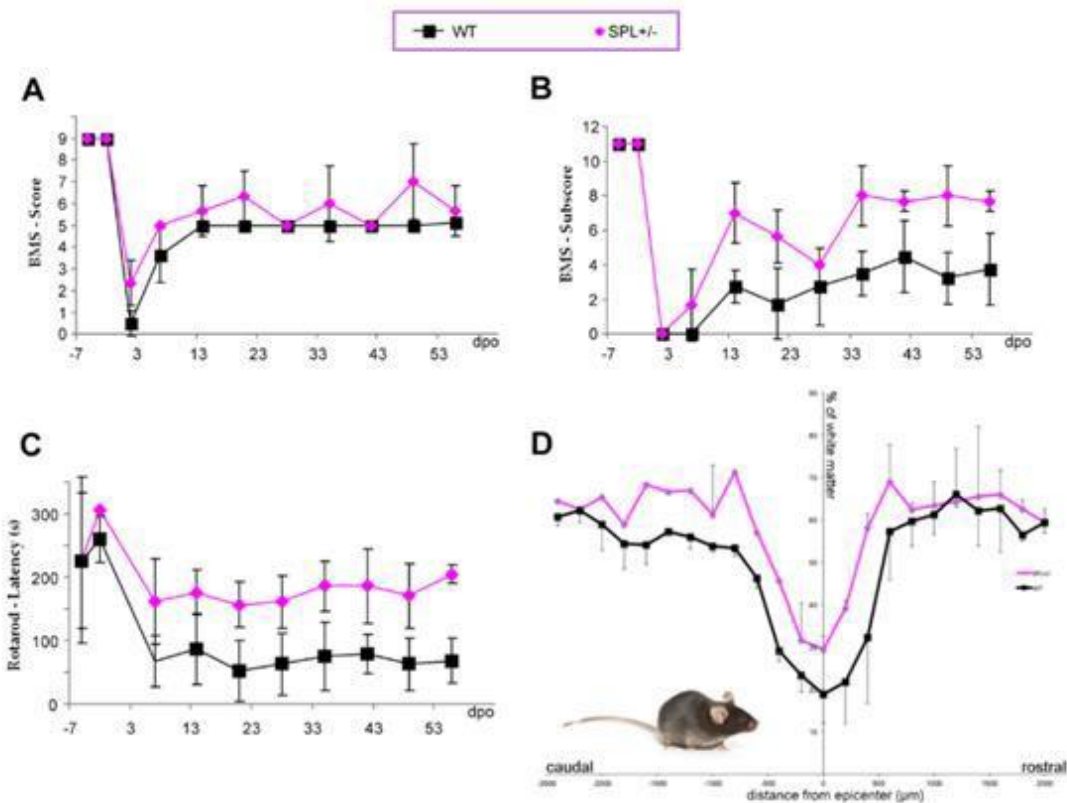


Figura 3. Recuperación motora después de la lesión experimental de la médula espinal.

En otra aproximación, el papel de la S1P/SPL en la recuperación tras la lesión experimental de la ME se investigó utilizando inhibidores químicos diseñados y preparados tal como se describe en los siguientes párrafos.

- *Modelo de homología a partir de la SPL bacteriana y diseño de una biblioteca virtual de inhibidores potenciales*

A partir de modelos de la SPL de levadura y de la SPL de *Symbiobacterium thermophilum*, se construyó un modelo de homología que se ha usado para diseñar inhibidores potenciales. Estos inhibidores se filtraron mediante técnicas de cribado virtual para dar lugar a una serie de 12 compuestos que fueron obtenidos por

condensación entre diversos ácidos carboxílicos y un precursor común (figura 4)

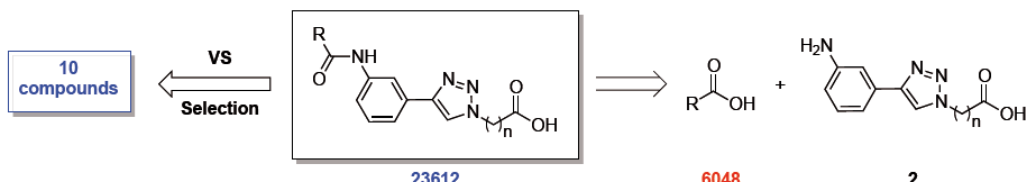


Figura 4. Compuestos resultantes de un precursor común obtenido por cribaje virtual.

Lamentablemente, los compuestos obtenidos resultaron inhibidores poco potentes. Esto puede atribuirse tanto a una sobreestimación de las interacciones electrostáticas predichas por los algoritmos de *docking* como a la incapacidad de los compuestos de alcanzar el centro activo de la enzima.

- *Síntesis de la 2-vinilesfingosina-1-fosfato (2VS1P) y análogos como inhibidores potenciales basados en el mecanismo de acción enzimática*

El compuesto RBM6-24 (en forma de mezcla de isómeros, figura 5) se obtuvo en una secuencia sintética de varias etapas. Tanto la mezcla de isómeros como las mezclas de los isómeros *syn* y *anti* se evaluaron como inhibidores de la SPL. Análogamente, se obtuvieron también los aminotioles RBM6-31 y JG-1, que se ensayaron como mezclas de isómeros.

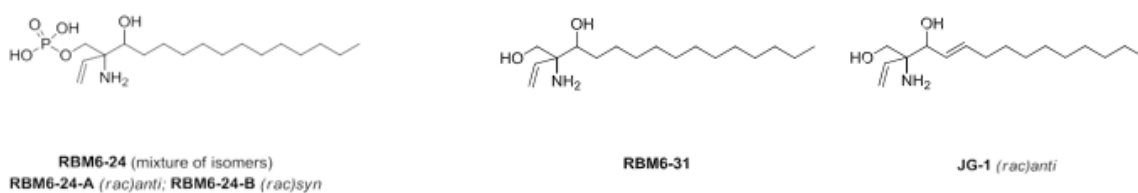


Figura 5. Inhibidores potenciales de la SPL basados en el mecanismo de acción.

- *Análogos no reactivos del intermedio de reacción y del sustrato diseñados como inhibidores potenciales de la SPL*

Los compuestos RBM7-12 y RBM7-32 fueron diseñados como análogos no reactivos

del intermedio de reacción postulado para la degradación de la dihidroesfingosina (dhSph) y la esfingosina (Sph), respectivamente, por la SPL (figura 6).

La inhibición de la actividad SPL por el compuesto RBM6-24 y los análogos no reactivos del intermedio de reacción (RBM7-12 y RBM7-32) fue determinada empleando hSPL y cultivos de células neuronales N2 (tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los compuestos sobre la actividad de la SPL.^a

Compuesto	IC50 (µM)	
	hSPL	Células N2 ^a
RBM6-24	12,1	42,1
RBM6-31	inactivo	inactivo
JG-1	inactivo	36,3
RBM6-24A	6,4	6,0
RBM6-24B	89,2	23,9
RBM7-12	81,1	19,4
RBM7-32	89,0	23,9

^aLas células N2 fueron expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos durante 24 horas y la actividad de la SPL se determinó en lisados celulares usando un ensayo fluorogénico descrito (Bedia *et al.*, *Chembiochem.* 2009, 10, 820).

A continuación, se evaluó la capacidad citoprotectora de los mejores inhibidores a concentraciones no tóxicas (RBM6- 24A y RBM7-32). Desgraciadamente, los compuestos no provocaron un aumento de la supervivencia celular después de la exposición a los estímulos proapoptóticos (datos no presentados).

Para evaluar la inhibición de la SPL para RBM6-24A y RBM7-32 *in vivo*, los compuestos se administraron vía i.p. en ratones. Desgraciadamente, no se observaron diferencias en la actividad de la SPL de la ME entre el control y los animales tratados. Para descartar que la falta de inhibición fuese debida a la incapacidad de los compuestos de atravesar la barrera hematoencefálica, la inhibición también se determinó *ex vivo* (en homogeneizados de tejido), pero tampoco se observó actividad inhibidora. Estos resultados indican que se requiere una mayor concentración de inhibidores o bien compuestos más potentes para bloquear la actividad de la SPL en animales.

Finalmente se diseñó una serie de análogos de la esfingosina-1-fosfato de

configuraciones definidas, en la que el grupo amino se reemplazó por un grupo azida no reactivo frente a la SPL. En base a consideraciones mecanísticas, el grupo amino de la S1P es crucial para la reacción con el PLP en la primera etapa del proceso catalítico por el que la SPL degrada la S1P en 2-hexadecanal y fosfato de 2-aminoetanol. Desde un punto de vista estructural, el grupo azida es capaz de ocupar el bolsillo de la amina en el centro catalítico de la enzima. Con objeto de explorar la estereoselectividad de la enzima frente a nuestros análogos de tipo azida, se sintetizaron los ocho posibles estereoisómeros resultantes de las diferentes configuraciones posibles en las posiciones C2 y C3, tal como se indica en la figura 6.



Figura 6. Intermedios de reacción y sustratos no reactivos frente a la SPL.

Tal como se indica en la tabla 2, estos nuevos compuestos mostraron una actividad inhibitoria de la SPL del orden de 10 μM , utilizando RBM13 a 125 μM como sustrato.

Tabla 2. Efecto de los compuestos sobre la actividad de la SPL.

Compuesto	IC50 (μM)
RBM7-89	10.1 \pm 1.6
RBM7-98	28.8 \pm 4.0
RBM7-111	5.2 \pm 0.8
RBM7-133	22.9 \pm 4.9
RBM7-114	25.7 \pm 3.4
RBM7-103	21.8 \pm 0.4
RBM7-128	10.8 \pm 0.3
RBM7-110	28.3 \pm 0.4

Los estudios de *docking* frente a la SPL humana y bacteriana confirmaron la actividad de todos los estereoisómeros de los azidofosfatos. Asimismo, se corroboró que tanto la estereoquímica del fragmento de azidoalcohol como la presencia de doble enlace entre

las posiciones C4 y C5 no son cruciales para la actividad, si bien el grupo fosfato es determinante para la misma.

- *Síntesis de sondas optimizadas para la determinación de la actividad enzimática de la SPL*

El compuesto RBM13 (figura 4) es una sonda fluorogénica que se desarrolló en nuestro grupo para la determinación de la actividad enzimática de la SPL en ensayos *in vitro*. A pesar de su selectividad, la afinidad mostrada por este sustrato resultó moderada. Ello nos llevó a diseñar análogos modificados de *segunda generación* que mejorasen las propiedades del sustrato original. A partir de consideraciones estructurales del centro activo de la enzima, razonamos que la afinidad de la sonda podría aumentar por alejamiento del resto de cumarina voluminosa del fragmento de aminofosfato en RBM13. De esta forma, se diseñaron los análogos RBM7-077 y RBM7-148 indicados en la figura 7.

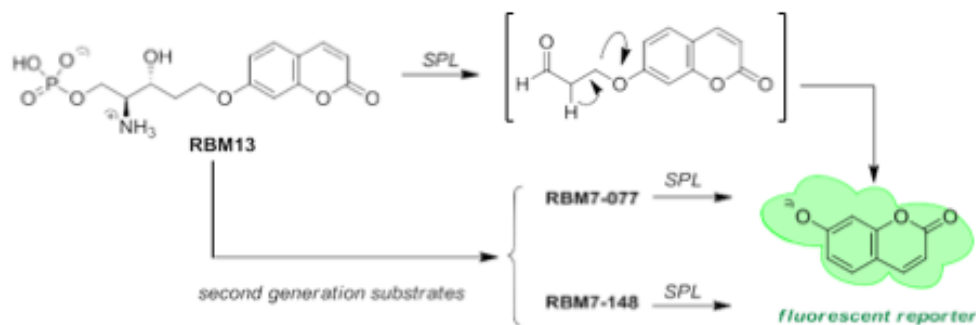


Figura 7. Sonda RBM13 y análogos de *segunda generación* (RBM7-077 y RBM7-148) como sondas para la determinación de la actividad enzimática de la SPL

De acuerdo con nuestras expectativas, estas nuevas sondas han resultado mejores sustratos de la reacción catalizada por la SPL, tal como se muestra en la tabla 3. Además, hemos visto que estas sondas, que no son permeables a las células, pueden ser formuladas en nanopartículas e incorporadas por las células.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la hSPL

Substrato	KM (mM)	Vmax (pmol·min ⁻¹)	Vmax/KM
RBM13	2071,7 ± 143,2	110,0 ± 23,8	0,05
RBM7-077	132,2 ± 14,2	262,7 ± 13,1	1,99
RBM7-148	509,4 ± 80,5	441,6 ± 21,9	0,87

3. Relevancia y posibles implicaciones

1. *Estudio del perfil de lípidos (esfingolípidos) como biomarcadores de la lesión medular.* Los análisis realizados tanto en modelo murino como en las muestras de plasma de humanos indican que hay cambios en algunas especies, además de la S1P. Estos cambios sugieren nuevas dianas terapéuticas. Habría que ampliar el número de muestras analizadas para validar los resultados preliminares obtenidos.
2. *La modulación de la concentración intracelular y extracelular de S1P mediante actuaciones sobre la SPL en el sistema nervioso central es una estrategia viable en la fisiopatología de la lesión medular.* Los resultados de la caracterización de la vía esfingosina-S1P-S1PR tras la lesión medular indican que la concentración de S1P depende exclusivamente de la concentración de esfingosina a tiempos cortos (hasta 24 horas) para luego verse modulada por la concentración y actividad de la SPL.
3. *Utilización de los métodos HTS puestos a punto para la determinación de actividades SPL.* Estos nueve métodos pueden permitir realizar estudios de actividad tanto en células como en tejidos de una manera rápida y sencilla.
4. *Posibilidad de modular la concentración de S1P mediante inhibidores de la SPL.* Los compuestos de tercera generación obtenidos en el proyecto, debidamente administrados, pueden causar incrementos significativos de S1P en el lugar de la lesión

4. Publicaciones

Cingolani F, Casasampere M, Sanllehi P, Casas J, Bujons, J, Fabriàs G.

Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II. J Lip Res. 2014, 55(8):1711-1720.

Sanllehi P, Abad JL, Casas J, Delgado, A.

Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase).

Chem Phys Lipids. 2016, 197:69-81

Casasampere M, Ordoñez YF, Pou A, Casas J.

Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology.

Chem Phys Lipids. 2016, 197:33-44

Del Aguila A *et al.*

Alterations in the sphingosine-1-phosphate signalling system following spinal cord injury.

(En preparación.)

Sanllehí P *et al.*

Design and synthesis of new coumarin-based sphingosine-1-phosphate lyase (S1PL) probes.

(En preparación.)

Sanllehí P *et al.*

New mechanism-based sphingosine-1-phosphate lyase (S1PL) inhibitors.

(En preparación.)

Calderón R *et al.*

Irreversibility of sphingosine 1-phosphate lyase inhibition by 2 vinyl dihydro sphingosine 1-phosphate stereoisomers.

(En preparación.)