

EVALUACIÓN *IN SILICO* DE LA INTERACCIÓN DE LA ENZIMA DPP-IV CON DERIVADOS DEL ÁCIDO CAFEICO

IN SILICO EVALUATION OF THE DPP-IV ENZYME INTERACTION WITH CAFFEIC ACID DERIVATIVES

Rochín-Medina, J.J.¹, Ramírez, K.², Mendoza-López, I.A.³, Ramírez-Serrano, E.S.⁴

¹Doctorado en Biotecnología de Alimentos. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Culiacán, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Correo: jesus.rm@culiacan.tecnm.mx, Tel.: 6674540100 Ext. 1303. Calle Juan de Dios Bátiz 310 pte, Colonia Guadalupe, 80220, Culiacán, Sinaloa, México. ²Doctorado en Ciencias en Biología Celular. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Culiacán, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Correo: hilda.rm@culiacan.tecnm.mx, Tel.: 6674540100 Ext. 1303. Calle Juan de Dios Bátiz 310 pte., Colonia Guadalupe, 80220, Culiacán, Sinaloa, México. ³Maestría en Ciencias. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Culiacán, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Correo: ilianne.ml@culiacan.tecnm.mx, Tel.: 6674540100 Ext. 1303. Calle Juan de Dios Bátiz 310 pte, Colonia Guadalupe, 80220, Culiacán, Sinaloa, México. ⁴Ingeniera Bioquímica. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Culiacán, Unidad de Posgrado. Correo: estephany.rs@culiacan.tecnm.mx, Tel.: 6674540100 Ext. 1303. Calle Juan de Dios Bátiz 310 pte, Colonia Guadalupe, 80220, Culiacán, Sinaloa, México.

Resumen -- Este estudio tuvo como objetivo evaluar mediante herramientas *in silico* el potencial inhibitor de la enzima Dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-IV) de los derivados del ácido cafeico. El ácido cafeico es un compuesto orgánico clasificado como ácido hidroxicinámico, se puede encontrar en una variedad de bebidas, como café preparado, en frutas, hierbas y especias. En primer lugar, se predijo la biotransformación metabólica del ácido cafeico mediante el servidor web Way2Drug y, a continuación, se determinó el acoplamiento molecular mediante el programa AutoDock Vina. Los resultados mostraron que la O-glucuronidación y la O-sulfatación fueron las principales reacciones encontradas y pertenecen a la fase II del metabolismo. Según el análisis *in silico*, el ácido cafeico 3-O-glucuronido y el ácido cafeico 4-O-glucuronido fueron los principales derivados del ácido cafeico que exhibieron las energías libres de afinidad más altas con la enzima DPP-IV (-8.0 y -8.1 kcal/mol, respectivamente) en comparación con los metabolitos sulfatados. Este estudio allana el camino para identificar los metabolitos glucuronizados del ácido cafeico como inhibidores potenciales de la DPP-IV, una enzima con un papel importante en el metabolismo de la glucosa.

Palabras Clave: Derivados del ácido cafeico, inhibición enzimática, ensayos *in silico*, acoplamiento molecular.

Abstract -- This study aimed to evaluate by *in silico* tools the Dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-IV) enzyme inhibitory potential of caffeic acid derivatives. Caffeic acid is an organic compound classified as a hydroxycinnamic acid, it can be found in a variety of beverages, as brewed coffee, in fruits, herbs and spices. First, the metabolic biotransformation of caffeic acid was predicted using the Way2Drug web server, then, molecular docking was determined by the AutoDock Vina program. Results showed that O-glucuronidation and O-sulfation were the main reactions found and belong to phase II metabolism. According to the *in silico*

analysis, caffeic acid 3-O-glucuronide and caffeic acid 4-O-glucuronide were the main caffeic acid derivatives that exhibited the highest binding free energies with the DPP-IV enzyme (-8.0 and -8.1 kcal/mol, respectively) as compared to sulfated metabolites. This study paves the way to identify the glucuronidated metabolites of caffeic acid as potential inhibitors of the DPP-IV, an enzyme with a major role in glucose metabolism.

Key words – Caffeic acid derivatives, enzyme inhibition, *in silico* assays, molecular docking.

INTRODUCCIÓN

Dipeptidil peptidasa 4 (DPP-IV) es una glicoproteína integral de membrana con actividad proteasa. La función principal de esta proteína es degradar moléculas bioactivas, como el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), para generar un rápido aumento posprandial de la glucosa en sangre en personas con diabetes tipo 2 [1]. Los inhibidores de DPP-IV permiten que el GLP-1 se acumule y permanezca más tiempo en el cuerpo, estimulando la secreción de insulina y reduciendo la glucosa en sangre posprandial. [2]. Interesantemente, bayas y cítricos [3], legumbres [4], sorgo [5, 6], y colza [7] contienen inhibidores naturales de la enzima DPP-IV, como compuestos fenólicos. Entre los principales grupos fenólicos, los ácidos hidroxicinámicos (AHC), como el ácido cafeico, presentan hasta el 70 % del AHC total y se encuentran en altas concentraciones en arándanos, kiwis, cerezas y manzanas, bebidas de café, posos de café y también se sintetizan mediante la fermentación de aguas residuales del maíz [8–11]. Algunos estudios informan que el ácido cafeico es un posible inhibidor de la enzima DPP-IV [12, 13], pero la absorción y biodisponibilidad de estos compuestos fenólicos (y otros ácidos hidroxicinámicos) dependen principalmente de sus reacciones metabólicas realizadas

en el intestino delgado, por lo que el metabolismo fenólico de fase I y II puede disminuir o aumentar su actividad biológica [14, 15].

El acoplamiento molecular es un método que predice la orientación favorecida de un ligando contra un receptor (proteína) para formar un complejo estable. Este método juega un papel esencial en el descubrimiento de fármacos, ya que considera las interacciones electrostáticas, las fuerzas de van der Waals, las interacciones de Coulomb y la formación de enlaces de hidrógeno para predecir la fuerza del enlace o la afinidad de unión en la interacción ligando-receptor. [16, 17]. La falta de información sobre el potencial inhibidor de DPP-IV de los derivados del ácido cafeico abre una oportunidad para el uso de herramientas bioinformáticas que permitan predecir los principales derivados y su capacidad para interactuar con esta enzima. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar mediante herramientas *in silico* el potencial inhibidor de DPP-IV de los derivados del ácido cafeico.

DESARROLLO

Moléculas SMILES y predicción de átomos reactivos

Para dilucidar las posibles reacciones de transformación metabólica del ácido cafeico y sus potenciales derivados, primero se obtuvieron las estructuras de los compuestos utilizando la base de datos Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), y sus códigos SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) (Tabla 1) se utilizaron para la predicción de átomos reactivos de ácido cafeico mediante el servicio web gratuito Way2Drug (<http://www.way2drug.com/ra/>) [18].

Way2drug calcula dos probabilidades independientes: la probabilidad de actividad (P_a) y la probabilidad de inactividad (P_i). La diferencia de probabilidades (ΔP) > 0.5 [19] se utilizó para dilucidar la posible vía de biotransformación del ácido cafeico. Luego se obtuvo la visualización de los átomos reactivos con el servidor web xenosite. (<https://swami.wustl.edu/xenosite>).

Tabla 1. Códigos SMILES del ácido cafeico y sus metabolitos.

Compuestos fenólicos	SMILES
Ácido cafeico	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)O)O</chem>
Ácido cafeico 3-O-glucurónido	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)OC2C(C(C(O2)C(=O)O)O)O)O</chem>
Ácido cafeico 4-O-glucurónido	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)OC2C(C(C(O2)C(=O)O)O)O)O</chem>
Ácido cafeico 3-O-sulfato	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)OS(=O)(=O)O)O</chem>
Ácido cafeico 4-O-sulfato	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)O)OS(=O)(=O)O</chem>
Sitagliptina (control)	<chem>C1CN2C(=NN=C2C(F)(F)F)CN1C(=O)CC(CC3=CC(=C(C=C3F)F)F)N</chem>

Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular se utilizó para evaluar la interacción de los derivados del ácido cafeico (ligandos) y la enzima DPP-IV (receptor). Antes del ensayo, se disminuyó la energía de los ligandos mediante el software Avogadro v1.2.0. Luego, se realizó la preparación de cristales de enzima DPP-IV (PDB 4N8D) con el software AutoDockTools v1.5.6; Se eliminaron las moléculas de agua y se agregaron las cargas de Kollman. El cristal de proteína (PDB 4N8D) tiene un sitio de unión a ligando en los residuos Arg125, Glu205, Glu206, Ser209, Phe357, Arg358, Tyr547, Ser630, Tyr631, Tyr662 y Tyr666 [20], y la grid box se ajustó al sitio de unión de la enzima. La energía libre de afinidad (ΔG) se calculó para cada interacción ligando-receptor; los valores negativos de ΔG representaron una mayor afinidad. Las imágenes 2D se tomaron de Discovery Studio v21.1.0.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Reacción metabólica del ácido cafeico

En la Figura 1a se muestra la evaluación *in silico* del metabolismo del ácido cafeico extraída de la plataforma Way2Drug. Según la plataforma Way2Drug, la O-glucuronidación ($\Delta P = 0.73$) y la O-sulfatación ($\Delta P = 0.64$) fueron la principal vía de biotransformación del ácido cafeico en los átomos 12 y 13 (Figura 1b). El ácido cafeico 3-O-glucurónido, el ácido cafeico 4-O-glucurónido, el ácido cafeico 3-O-sulfato y el ácido cafeico 4-O-sulfato fueron los principales derivados del ácido cafeico propuestos (Figura 2) y se consideran productos obtenidos de la fase II del metabolismo. Las reacciones metabólicas de fase II O-glucuronidación y O-sulfatación pueden desarrollarse en los enterocitos mediante las enzimas uridina-5'-difosfoglucuronosiltransferasa (UGT) y sulfotransferasa (SULT), respectivamente [15].

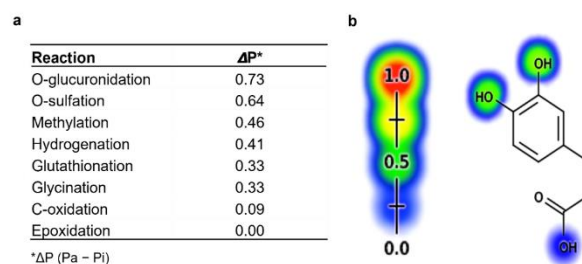


Figura 1. Átomos reactivos. (a) Tipos de reacciones de ácido cafeico obtenidas por el servidor web Way2Drug (<http://www.way2drug.com/ra/>); (b) Sitios de átomos reactivos predichos por XenoSite (<https://swami.wustl.edu/xenosite>), la escala va del azul al rojo, donde el rojo es el que tiene mayor probabilidad de reacción.

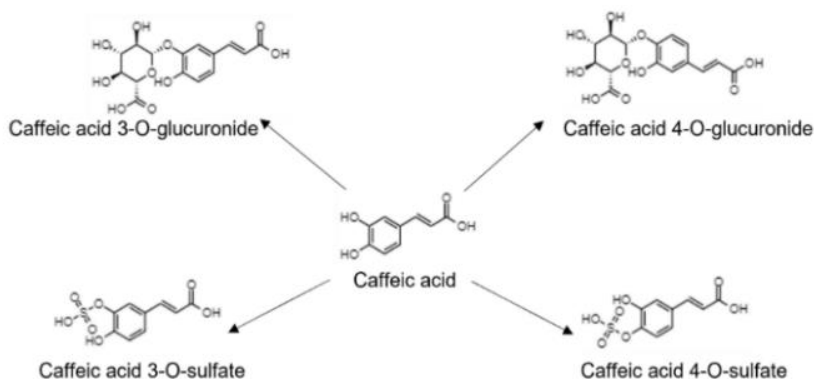


Figura 2. Derivados metabólicos del ácido cafeico.

Se informó que el ácido cafeico 3-O-glucurónico y el ácido cafeico 4-O-glucurónico del extracto de hoja de *Stauntonia hexaphylla* se encontraron en plasma de ratas después de la administración oral de ácidos clorogénico, criptoclorogénico y neoclorogénico [21]. Según los autores, estos ácidos clorogénicos podrían transformarse en ácido cafeico y, posteriormente, en compuestos glucuronidados. Además, un estudio relacionado con biomarcadores en el consumo de café reportó la presencia en plasma principalmente de ácido cafeico 3-O-sulfato y trazas de ácido cafeico 4-O-sulfato [22], posiblemente debido a las transformaciones en el intestino delgado de los ácidos clorogénicos del café 1h después de su consumo.

Acoplamiento Molecular

Los residuos de aminoácidos de conservación de la enzima DPP-IV humana Glu205, Glu206 y Tyr547 desempeñan un papel esencial en la actividad enzimática [23–25].

Se utilizó un ensayo de acoplamiento molecular para investigar la afinidad de unión del ácido cafeico y sus metabolitos con la enzima DPP-IV (Tabla 2). La Figura 3 muestra la interacción entre el ácido cafeico y sus metabolitos con la enzima DPP-IV.

El ácido cafeico 4-O-glucurónico (Figura 3) y el ácido cafeico 3-O-glucurónico fueron los metabolitos que presentaron la mejor energía libre de afinidad con -8.1 y -8.0 kcal/mol, respectivamente, y mostraron interacciones de enlaces de hidrógeno con los residuos de aminoácidos del sitio de unión-proteína Glu205, Glu205 y Tyr 547 (Tabla 2), excepto el ácido cafeico 4-O-glucurónico, que interactúa con Glu205 mediante fuerzas de van der Waals (Figura 3). Sitagliptina (control), un fármaco utilizado para el control de DPP-IV en sujetos con diabetes tipo 2 [26], presentó una energía libre de afinidad ligeramente mayor que el ácido cafeico glucuronidado; la sitagliptina interactúa sólo con el residuo Tyr547 mediante un enlace de hidrógeno (Tabla 2). Estos resultados sugieren la importancia de Tyr547 en la actividad catalítica de DPP-IV sobre Glu205 y Glu206. Se estudiaron diferentes ácidos fenólicos y flavonoides como inhibidores de la DPP-IV, con un rango de energía libre de afinidad entre -5.7 y -9.3 kcal/mol. Estos resultados están relacionados con el número de interacciones de cada compuesto fenólico estudiado con la enzima, el número de interacciones y las interacciones polares con los residuos Glu205, Glu206 y Tyr547 [27–29].

Tabla 2. Energías libres de afinidad del ácido cafeico y sus derivados con la enzima DPP-IV.

Compuestos fenólicos	Energía libre de afinidad (kcal/mol)	Tipo de interacciones ¹	Interacciones de tipo puente de hidrógeno ²
Ácido cafeico	-6.2	3	Glu205, Glu206, Tyr631.
Ácido cafeico 3-O-glucurónico	-8.0	3	Glu205, Glu206, Tyr631, Tyr547, Tyr585, Tyr662, Tyr666.
Ácido cafeico 4-O-glucurónico	-8.1	4	Glu206, Tyr547, Tyr631, Tyr666, Tyr666, Asn710.
Ácido cafeico 3-O-sulfato	-6.6	7	Arg358, Tyr631, Tyr662, Arg669.
Ácido cafeico 4-O-sulfato	-7.3	4	Glu205, Glu206, Ser209, Tyr631.

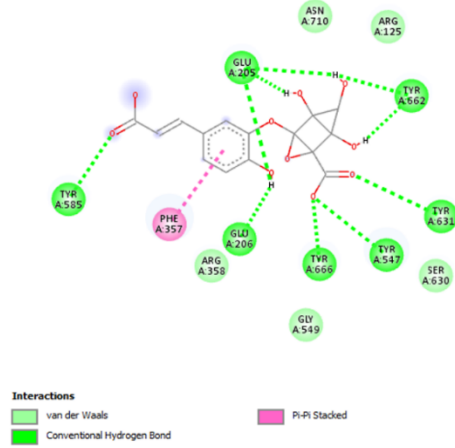
Sitagliptina
(control)

-8.7

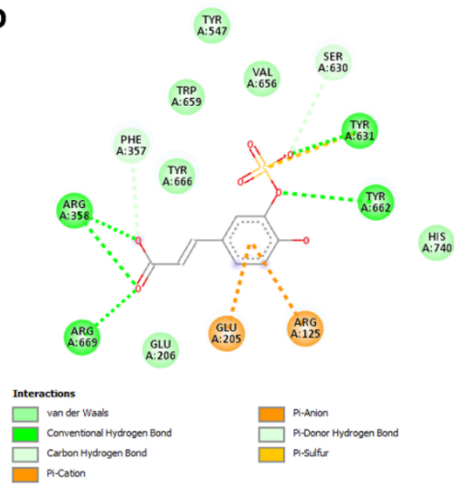
7

Arg125, Tyr547, Trp629, Asn710.

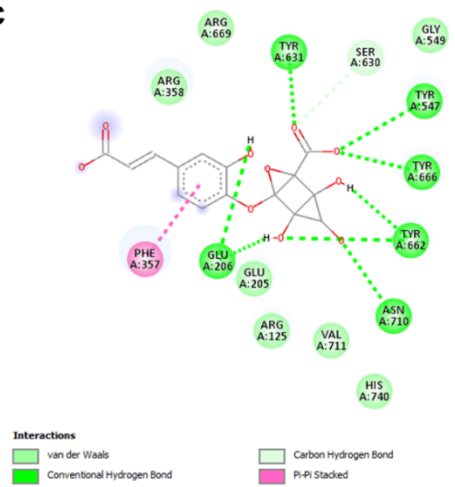
a



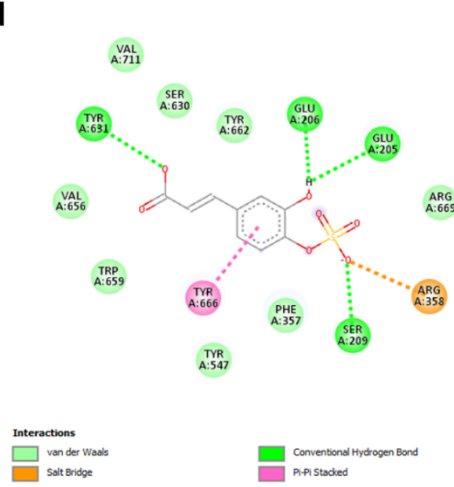
b



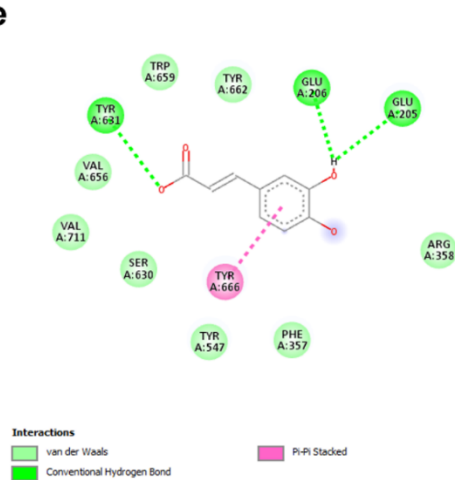
c



d



e



f

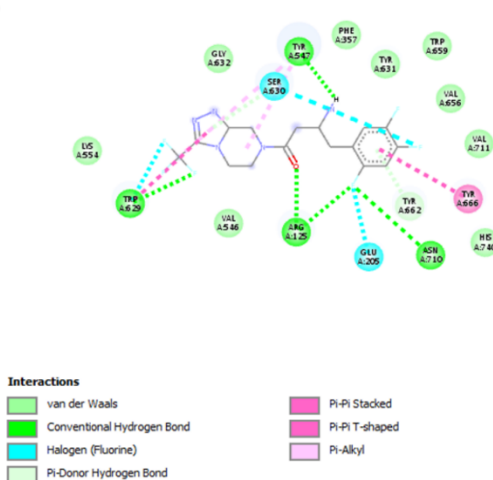


Figura 3. Interacciones del ácido cafeico y sus derivados: (a) ácido cafeico 3-O-glucuronido, (b) ácido cafeico 3-O-sulfato, (c) ácido cafeico 4-O-glucuronido, (d) ácido cafeico 4-O-sulfato, (e) ácido cafeico y (f) sitagliptina con enzima DPP-IV.

CONCLUSIONES

Las herramientas bioinformáticas pueden predecir los derivados metabólicos del ácido cafeico. Las formas glucuronizadas de ácido cafeico presentaron la mayor energía libre de afinidad con DPP-IV, al igual que el control de sitagliptina. Aunque se informa que Glu205 y Glu206 son aminoácidos importantes en la actividad catalítica de DPP-IV, la interacción unida a hidrógeno de los derivados del ácido cafeico con el residuo Tyr547 podría ser el aminoácido con mayor impacto en la energía libre de afinidad. Como futuras líneas de investigación se proponen la síntesis de los derivados glucuronizados del ácido cafeico para la evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio contra la enzima DPP-IV como mecanismo de control glucémico, así como su análisis de toxicidad.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se realizó con el apoyo financiero de la Tecnológico Nacional de México – Instituto Tecnológico de Culiacán.

BIBLIOGRAFÍA

[9] Coll, C., Colomina, R., Onrubia, J. y Rochera, M. J. (1992). Actividad conjunta y habla: una aproximación al estudio de los mecanismos de influencia educativa. *Infancia y Aprendizaje*, 59-60, pp.189-232.

[1] Singh AK, Yadav D, Sharma N, Jin JO (2021) Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV Inhibitors with Antioxidant Potential Isolated from Natural Sources: A Novel Approach for the Management of Diabetes. *Pharmaceuticals* 14:586.

[2] Gribble FM, Reimann F (2021) Metabolic Messengers: glucagon-like peptide 1. *Nat Metab* 3:142–148.

[3] Fan J, Johnson MH, Lila MA, et al (2013) Berry and citrus phenolic compounds inhibit dipeptidyl peptidase IV: Implications in diabetes management. *Evidence-based Complement Altern Med* 2013.

[4] Di Stefano E, Tsopmo A, Oliviero T, et al (2019) Bioprocessing of common pulses changed seed microstructures, and improved dipeptidyl peptidase-IV and α -glucosidase inhibitory activities. *Sci Rep* 9:15308.

[5] Dai L, Kong L, Cai X, et al (2022) Analysis of the Structure and Activity of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Oligopeptides from Sorghum Kafirin. *J Agric Food Chem* 70:2010–2017.

[6] Cian RE, Albarracín M, Garzón AG, Drago SR (2022) Precooked sorghum flour as proper vehicle of ACE-I and DPP-IV inhibitory sorghum peptides. *Int J Food Sci Technol* 57:4832–4839.

[7] Xu F, Xu B, Chen H, et al (2022) Enhancement of DPP-IV inhibitory activity and the capacity for enabling GLP-1 secretion through RADA16-assisted molecular

designed rapeseed peptide nanogels. *Food Funct* 13:5215–5228.

[8] El Gharras H (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *Int J Food Sci Technol* 44:2512–2518.

[9] Birková A (2020) Caffeic acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. *Bioact Compd Heal Dis* 3:74.

[10] Ramírez K, Quintero-Soto MF, Rochín-Medina JJ (2020) Enhancement of the antioxidant and antimicrobial activities of maize wastewater by an eco-friendly process. *J Food Meas Charact* 14:1682–1689.

[11] Rochín-Medina JJ, López-Moreno HS, Ramírez K (2021) Effect of *Bacillus clausii*-fermented spent coffee ground extract on *Salmonella*-infected macrophages. *Lwt* 137:.

[12] Istyastono EP, Octa Riswanto FD (2022) Molecular Dynamics Simulations of the Caffeic Acid Interactions to Dipeptidyl Peptidase IV. *Int J Appl Pharm* 14:274–278.

[13] Balogun FO, Naidoo K, Aribisala JO, et al (2022) Cheminformatics Identification and Validation of Dipeptidyl Peptidase-IV Modulators from Shikimate Pathway-Derived Phenolic Acids towards Interventive Type-2 Diabetes Therapy. *Metabolites* 12:937.

[14] Truzzi F, Tibaldi C, Zhang Y, et al (2021) An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS). *Int J Mol Sci* 22:5514.

[15] Sova M, Saso L (2020) Natural sources, pharmacokinetics, biological activities and health benefits of hydroxycinnamic acids and their metabolites. *Nutrients* 12:1–30.

[16] de Ruyck J, Brysbaert G, Blossey R, Lensink M (2016) Molecular docking as a popular tool in drug design, an *in silico* travel. *Adv Appl Bioinforma Chem* Volume 9:1–11.

[17] Tao X, Huang Y, Wang C, et al (2020) Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *Int J Food Sci Technol* 55:33–45.

[18] Rudik A V., Dmitriev A V., Lagunin AA, et al (2016) Prediction of reacting atoms for the major biotransformation reactions of organic xenobiotics. *J Cheminform* 8:68.

[19] Reyes-Chaparro A, Verdín-Betancourt FA, Sierra-Santoyo A (2020) Human Biotransformation Pathway of Temephos Using an *in silico* Approach. *Chem Res Toxicol* 33:2765–2774.

[20] Namoto K, Sirockin F, Ostermann N, et al (2014) Discovery of C-(1-aryl-cyclohexyl)-methylamines as selective, orally available inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Bioorg Med Chem Lett* 24:731–736.

[21] Choi WG, Kim JH, Kim D, et al (2018) Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid Isomers and Metabolites in Rat Plasma Using LC-MS/MS and Its Application to A Pharmacokinetic Study Following Oral Administration of *Stauntonia hexaphylla* Leaf Extract (YRA-1909) to Rats. *Pharmaceutics* 10:143.

[22] Stalmach A, Mullen W, Barron D, et al (2009) Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. *Drug Metab Dispos* 37:1749–1758.

[23] Bjelke JR, Christensen J, Branner S, et al (2004) Tyrosine 547 Constitutes an Essential Part of the Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. *J Biol Chem* 279:34691–34697.

[24] Kirby M, Yu DMT, O’connor S, Gorrell MD (2010) Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition. *Clin Sci* 118:31–41.

[25] Abbott CA, McCaughan GW, Gorrell MD (1999) Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted β propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Lett* 458:278–284.

[26] Ahren B (2010) Use of DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes: focus on sitagliptin. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* 3:31–41.

[27] Pan J, Zhang Q, Zhang C, et al (2022) Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 by Flavonoids: Structure–Activity Relationship, Kinetics and Interaction Mechanism. *Front Nutr* 9:1–17.

[28] Tuersuntuoheti T, Pan F, Zhang M, et al (2022) Prediction of DPP-IV Inhibitory Potentials of Polyphenols Existed in Qingke Barley Fresh Noodles: *In Vitro* and *In Silico* Analyses. *J Food Process Preserv* e16808.

[29] Li M, Bao X, Zhang X, et al (2022) Exploring the phytochemicals and inhibitory effects against α -glucosidase and dipeptidyl peptidase-IV in Chinese pickled chili pepper: Insights into mechanisms by molecular docking analysis. *LWT* 162:113467.

Estephany S. Ramírez Serrano



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.

ROLES DE CONTRIBUCIONES

Rol	Autor (es)
Conceptualización	Jesús Jaime Rochín Medina Karina Ramírez
Curación de datos	Estephany S. Ramírez Serrano
Metodología	Ilianne Annel Mendoza López
Administración del proyecto	Jesús Jaime Rochín Medina Ilianne Annel Mendoza López
Supervisión	Jesús Jaime Rochín Medina Karina Ramírez
Validación	Estephany S. Ramírez Serrano
Escritura-Preparación del borrador original	Jesús Jaime Rochín Medina Estephany S. Ramírez Serrano Ilianne Annel Mendoza López
Escritura-Revisión y edición	Jesús Jaime Rochín Medina Karina Ramírez