

ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE LA ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUCTASA DE EXTRACTOS DE ESPONJAS MARINAS DEL GOLFO DE URABÁ

INHIBITORY ACTIVITY OF SOME MARINE SPONGE EXTRACTS FROM URABÁ GULF ON DIHYDROFOLATE REDUCTASE ENZYME

Diego A. ZABALA.¹, Bibiana ECHAVARRÍA.^{1*}, Alejandro MARTÍNEZ.¹

Recibido: Noviembre 11 de 2007 Aceptado: Julio 8 de 2008

RESUMEN

La enzima dihidrofolato reductasa está implicada en la producción de la base pirimidínica timidina, componente esencial de la estructura del ADN. Por tanto, cualquier sustancia que la inhiba tiene como efecto la inhibición de la síntesis del ADN, y es potencialmente útil para el tratamiento de varios tipos de cáncer como leucemias linfoblásticas. En este trabajo se determina el grado de inhibición que los extractos etanólicos obtenidos de las esponjas marinas colombianas *Svenzea zeai*, *Amphimedon compressa*, *Ircinia campana*, *Aplysina archeri*, *Xestospongia proxima* y *Xestospongia muta*, presentan sobre la enzima purificada de origen humano dihidrofolato reductasa. Los resultados muestran que la mayoría de los extractos de estas esponjas inhiben esta enzima. Estos resultados se comparan con los del medicamento usado contra el cáncer, Metotrexate[®], el cual se utiliza como control de inhibición de los ensayos y se observa que algunas de las esponjas tienen mayor inhibición que este medicamento.

Palabras clave: Dihidrofolato reductasa, metotrexate[®], esponjas marinas.

ABSTRACT

Dihydrofolate reductase is an enzyme involved in the production of pyrimidinic base thymidine, a structural component of DNA, therefore whatever substance that inhibits this enzyme inhibits DNA synthesis as a consequence and it can be potentially useful as a treatment of several types of cancer like lymphoblastic leukemias. In this work we determine the inhibition grade that the ethanol extracts from Colombian marine sponges: *Svenzea zeai*, *Amphimedon compressa*, *Ircinia campana*, *Aplysina archeri*, *Xestospongia proxima* and *Xestospongia muta*, over the human purified enzyme dihydrofolate reductase. The results shown that most of marine sponge extracts inhibit the enzyme. Results are compared with methotrexate[®] a medication used against cancer which is used as a control for the bioassays. Results demonstrate that some of the analyzed extracts have more inhibition than the control methotrexate[®].

Key words: Dihydrofolate reductase, metotrexate[®], marine sponges.

¹ Grupo de Investigación sobre Productos Naturales Marinos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín – Colombia.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: bibianaech@farmacia.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

El mar es una de las fuentes de recursos naturales más ricas e inexploradas de la naturaleza. Dentro de tales recursos se incluyen organismos invertebrados marinos, como las esponjas, que han demostrado contener una amplia diversidad de sustancias con novedosas estructuras químicas y actividades biológicas interesantes (1). Esto las ha convertido en objetivo para la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos capaces de ayudar en el tratamiento de múltiples enfermedades humanas.

La enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) está implicada en la producción de tetrahidrofolato (THF), cofactor esencial para la síntesis de ciertos metabolitos indispensables para las células. La mayoría de las bacterias y plantas producen este cofactor por biosíntesis de *novo* a partir del ácido p-aminobenzoico PABA (2); en algunas bacterias y células de mamíferos como el hombre, la producción de folatos depende de fuentes externas obtenidas de la dieta y posee vías alternas para reducir folatos, purinas y pirimidinas (3). Desde hace varios años se ha emprendido una búsqueda de compuestos llamados antifolatos, que interfieran con estas vías, para poderlos así usar clínicamente como agentes antibacteriales (Trimethoprim[®]), antimaláricos (Pyrimethamine[®]) y antitumorales (Methotrexate[®]) (4).

De las esponjas marinas se han aislado sustancias con actividad inhibitoria de enzimas, y especialmente sobre la fosfolipasa A2 (5), y la Na/K-ATPasa (6) Mas recientemente se han aislado sustancias inhibitorias de enzimas como la manzamina-Y inhibitoria de la enzima GSK3 implicada en el mal de Alzheimer (7), las aeruginosinas que inhiben la trombina (8) y el (+)-curcufenol que inhibe la Tie2-quinasa la cual es esencial para el crecimiento de tumores (9). Sin embargo, en la revisión hecha para este trabajo no se encontraron reportes de estudios sobre la dihidrofolato reductasa.

En este estudio se presentan los resultados obtenidos al medir la actividad inhibitoria sobre la enzima dihidrofolato reductasa, de los extractos etanólicos de seis esponjas marinas recolectadas en el Golfo de Urabá (Colombia), como una primera aproximación en la búsqueda de sustancias inhibitorias de enzimas en las esponjas marinas colombianas, y como una contribución al inventario del potencial biológico y químico de los recursos marinos colombianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Las muestras se recolectan en el Golfo de Urabá, a profundidades entre 9 y 21 metros en diversas localidades de la zona, junto a la frontera con Panamá. Los materiales extraños y otros organismos son removidos de las muestras con un cuchillo. Las muestras son congeladas (-10 °C) y llevadas al laboratorio donde son cortadas en trozos pequeños y secadas (40 °C). La identificación se lleva a cabo por el biólogo marino D. Valderrama. Las muestras son depositadas en la colección Porífera del Museo de Historia Natural Marina de Colombia (MHNMC), en Inveemar, Santa Marta (Colombia) (4).

Preparación de los extractos

Las muestras secas son sometidas a extracción con etanol de la siguiente manera: la muestra molida y pesada se extrae exhaustivamente con etanol y se filtra; el filtrado se concentra a sequedad bajo presión reducida y a 40 °C de temperatura. El residuo que se obtiene constituye el extracto etanólico crudo. Los extractos se conservan bajo refrigeración, protegidos de la luz, el aire, el calor y la humedad, hasta la preparación de las concentraciones de extracto (inhibidor) requeridas para el ensayo con la enzima.

Procedimiento del ensayo de inhibición

Se utiliza un espectrofotómetro ultravioleta con termostato Cary 50 (VARIAN[®]). La longitud de onda se fija en 340 nm y a una temperatura de 22 °C, (programa cinético de lectura cada 15 segundos en un tiempo total de 2.5 minutos). Se adiciona la cantidad de *buffer* de ensayo para *dihidrofolato reductasa* (diluido 1X) requerida en cada uno de los tubos. Se adiciona luego la enzima dihidrofolato reductasa (1.5×10^{-3} unidades) a cada tubo y se homogeniza. Se adiciona la cantidad requerida de inhibidor ó extracto (1 μ M para el Metotrexate[®] y 1 ppm para los extractos) y se homogeniza (en la determinación de la actividad de la enzima, este paso se omite). Se transfiere el contenido del tubo que va a ser probado a una cubeta de cuarzo de 1 mL. Se agregan 6 μ L de la solución de NADPH 10 mM (cofactor de la reacción), se cubre la cubeta con papel parafinado y se homogeniza. Se agregan 5 μ L de ácido dihidrofólico (concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM) justo antes de empezar la reacción (sustrato de la

reacción). Se cubre la cubeta con papel parafinado, se mezcla por inversión y se introduce de inmediato al espectrofotómetro. Se leen las absorbancias a 340 nm cada 15 segundos en un tiempo total de 2.5 minutos. (10,11)

Cálculo de la constante de inhibición

La cinética de actividad de la DHFR se calcula usando la ecuación de Michaelis–Menten, y la cinética de inhibición se determina mediante la ecuación de Lineweaver–Burk. (12)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los ensayos de inhibición enzimática que se realizan a los seis extractos etanólicos de las

esponjas marinas obtenidas en el Golfo de Urabá y al inhibidor patrón Metotrexate se elaboran las gráficas de inhibición enzimática.

En el gráfico de actividad enzimática (figura 1) se puede observar que hay inhibición por el Metotrexate® y que ésta es de tipo competitivo. A su vez, los extractos que presentan el mismo tipo de inhibición son los de las esponjas, *Ircinia campana* (figura 2), *Svenzea zeai* (figura 3) y *Xestospongia proxima* (figura 4). La gráfica de la cinética de inhibición para los extractos de *Amphimedon compressa* y *Aplysina archeri* (figura 5) muestra inhibición no competitiva. Para el caso del extracto de *Xestospongia muta* (figura 6) se observa que el tipo de gráfica no corresponde a lo esperado para una cinética de inhibición enzimática normal.

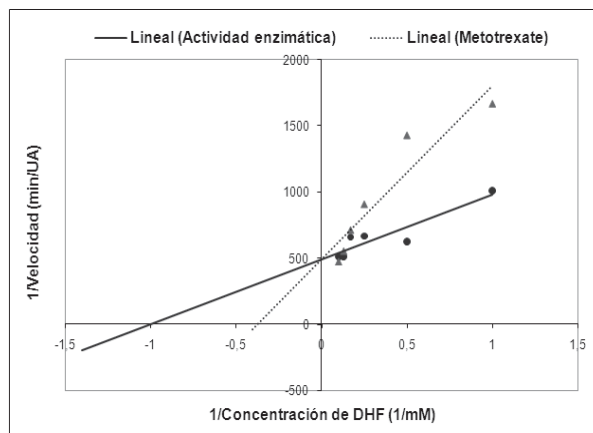


Figura 1: Comparación de la cinética de actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa con la cinética de inhibición del Metotrexate®

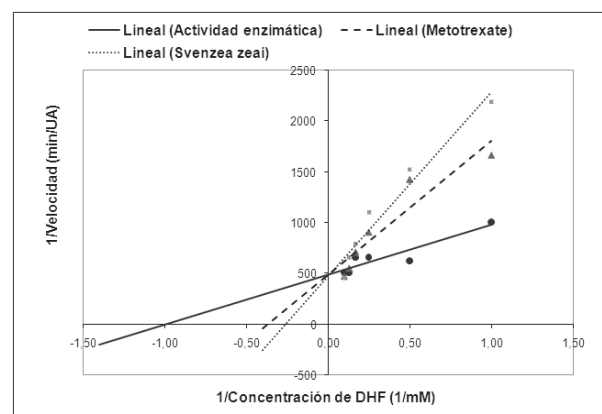


Figura 3: Comparación de la inhibición del Metotrexate® contra la inhibición del extracto etanólico de la esponja *Svenzea zeai*, sobre la actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa

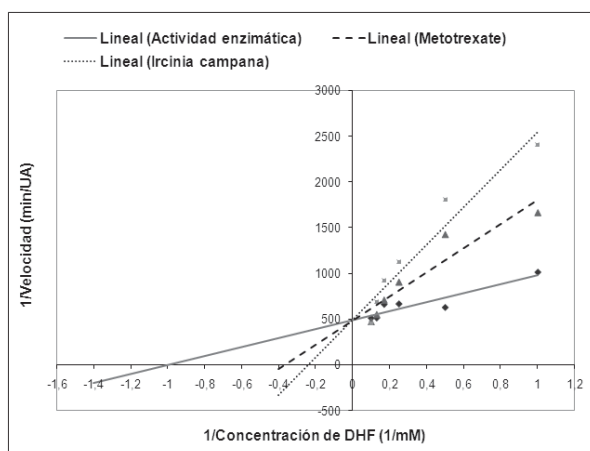


Figura 2: Comparación de la inhibición del Metotrexate® contra la inhibición del extracto etanólico de la esponja *Ircinia campana*, sobre la actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa

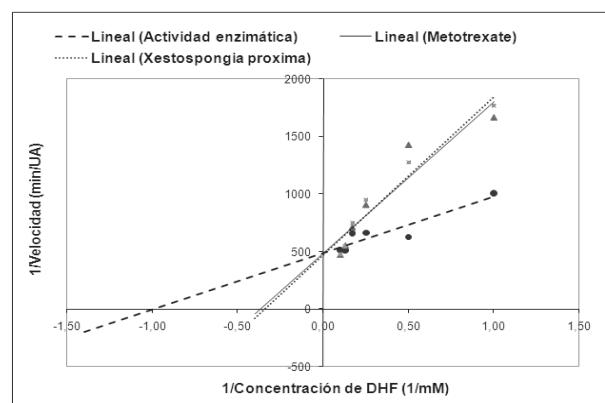


Figura 4: Comparación de la inhibición del Metotrexate® contra la inhibición del extracto etanólico de la esponja *Xestospongia proxima*, sobre la actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa

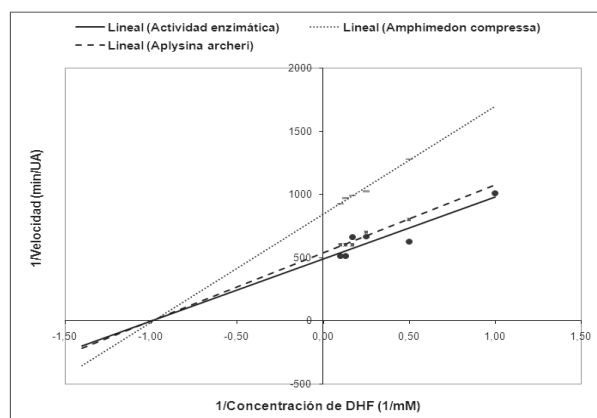


Figura 5: Comparación de la inhibición de los extractos etanólicos de las esponjas *Amphimedon compressa* y *Aplysina archeri*

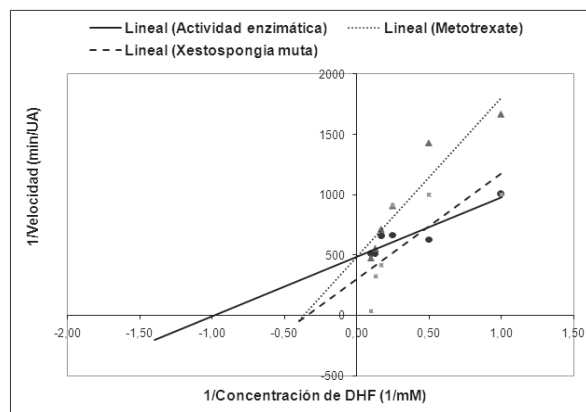


Figura 6: Comparación de la inhibición del Metotrexate® contra la inhibición del extracto etanólico de la esponja *Xestospongia muta*, sobre la actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa

De acuerdo con la ecuación de Lineweaver-Burk, se obtienen los valores de K_m y de velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$) de los extractos de las esponjas (tabla 1). La actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa presenta una $K_m = 1.001$ mM y una $V_{m\acute{a}x}: 0.002$ UA/min (tabla 2).

A un valor mayor de K_m aparente se tiene un mayor grado de inhibición (12). Los resultados muestran que el Metotrexate® presenta una menor inhibición en comparación con los extractos de *Ircinia campana*, *Svenzea zeai* y *Xestospongia proxima*, respectivamente.

Para el caso de la inhibición no competitiva, el análisis se basa en el valor de la velocidad máxima de reacción (a menor $V_{m\acute{a}x}$, mayor inhibición) (12), con lo cual se observa que el extracto de *Amphimedon compressa* presenta mayor inhibición que el de *Aplysina archeri*.

La relación entre los datos obtenidos de velocidad de reacción y K_m aparente, se confirman con los coeficientes de correlación dados por las gráficas; sin embargo, el extracto de *Xestospongia muta* no presenta una buena concordancia entre sus datos y no se puede determinar ni el tipo ni el grado de inhibición.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de inhibición de los extractos y el Metotrexate® sobre la enzima dihidrofolato reductasa.

Inhibidor	V_{max} UA/min	K_m mM aparente	Coefficiente de correlación (r)
Amphimedon compressa	0.0012	1.001	0.97
Aplysina archeri	0.0019	1.047	0.99
Ircinia campana	0.0020	4.184	0.96
Svenzea zeai	0.0023	3.817	0.98
Xestospongia proxima	0.0021	2.959	0.97
Metotrexate®	0.0020	2.740	0.94
Xestospongia muta	0.0048	2.940	0.74

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la actividad enzimática para la dihidrofolato reductasa

Parámetro cinético	Valor
V_{max} UA/min	0.0020
K_m (mM)	1.001
Coefficiente de correlación (r)	0.92

CONCLUSIONES

De las seis especies de esponjas analizadas, tres presentan inhibición mayor que el control Metotrexate® sobre la enzima dihidrofolato reductasa: *Ircinia campana*, *Svenzea zeai* y *Xestospongia proxima*. Lo anterior indica que estas esponjas son promisorias para investigarlas más a fondo, con el fin de aislar y caracterizar las moléculas activas capaces de inhibir la enzima, pues pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos antitumorales.

La inhibición de los extractos sobre la enzima se debe posiblemente a la ocupación de todos los sitios activos de la enzima por el complejo grupo de compuestos moleculares presentes en las esponjas marinas, presentándose así un bloqueo de la actividad enzimática. Por esto, es necesario, en el futuro, realizar aislamientos de las moléculas responsables de esta inhibición para evaluar su actividad frente a la enzima.

Para realizar la comparación de una serie de compuestos inhibidores, es necesario tener en cuenta si se habla de inhibición competitiva o no competitiva. Tanto en las gráficas como en los datos de velocidad, se ve claramente que con los extractos de las esponjas *Aplysina archeri* y *Amphimedon compressa*, no se da una inhibición competitiva, debido a que hay variación en la velocidad, más no en el valor de K_m . Debido a esto, no pueden ser comparadas contra el Metotrexate®, que es un inhibidor competitivo. Los extractos de *Xestospongia proxima*, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana* muestran a su vez, al no presentar cambios significativos en la velocidad de reacción, que el tipo de inhibición es competitiva.

Se recomienda evaluar otras especies de esponjas del Golfo de Urabá, ya que en este estudio sólo se analizaron seis de las muchas existentes en esta inexplorada región del Caribe Colombiano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Cheminform* 2004; 35 (20): 1 – 49.
2. Kompis IM, Islam K, Then RL. DNA and RNA synthesis: antifolates. *Chem Rev.* 2005; 105(2): 593-620.
3. Gilbert IH. Inhibitors of dihydrofolate reductase in Leishmania and Trypanosomes. *BBA Molecular Basis of Disease* 2002; 1587: 249– 257.
4. Galeano E, Martínez A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Médicale* 007; 17: 21—24.
5. Cheung AK, Murelli R, Snapper ML. Total Syntheses of (+)- and (-)-Cacospongionolide-B, Cacospongionolide- E, and related analogues. Preliminary study of structural features required for phospholipase A₂ inhibition. *J. Org. Chem.* 2004; 69: 5712-5719.
6. Gorshkova IA, Gorshkov BA, Fedoreev SA, Stonik V. Halenquinol, a natural cardioactive pentacyclic hydroquinone, interacts with sulfhydryls on rat brain Na⁺,K⁺-ATPase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology* 2001; 128 (4): 531-540.
7. Rao KV, Donia MS, Peng J, García-Palomero E, Alonso D, Martínez A, et al. Manzamine B and E and Ircinal a related alkaloids from an Indonesian *Acanthostrongylophora* sponge and their activity against Infectious, tropical parasitic, and Alzheimer's diseases. *J. Nat. Prod.* 2006; 69 (7): 1034-1040.
8. Hanessian S, Del Valle J. Total synthesis and structural confirmation of Chlorodysinosin-A. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 8: 2733-2738.
9. Cichewicz RH, Clifford LJ, Lassen PR, Xiaolin C, Freedman TB, Nafie LA, et al. Stereochemical determination and bioactivity assessment of (S)-(+)-curcuphenol dimers isolated from the marine sponge *Didiscus aceratus* and synthesized through laccase biocatalysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13 (19): 5600-5612.
10. Pez D, Leal I. 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of leishmanial and trypanosomal dihydrofolate reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003; 11: 4693 –4711.
11. SIGMA-ALDRICH. Dihydrofolate Reductase Assay Kit. TECHNICAL BULLETIN. p 1-4.
12. Murray R. et al. (1994) Bioquímica de Harper. En: Rodwell W. Capítulo 9. Enzimas: Cinética. 13 ed. México: El Manual Moderno. p 98-99.