

Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima dihidrofolato reductasa de los extractos de esponjas marinas del Golfo de Urabá

Bibiana Echavarría, Diego Zabala, Alejandro Martínez

INTRODUCCIÓN

El mar es una de las fuentes de recursos naturales más ricas e inexploradas de la naturaleza. Dentro de tales recursos se incluyen los organismos invertebrados marinos como las esponjas, que han demostrado contener una amplia diversidad de sustancias con novedosas estructuras químicas y actividades biológicas interesantes¹. Esto, las ha convertido en objetivos para la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos capaces de ayudar en el tratamiento de múltiples enfermedades humanas.

Por su parte, la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) está implicada en la producción del tetrahidrofolato (THF), un cofactor importante y esencial para la síntesis de timidina, una de las bases pirimidínicas de la estructura del DNA². Por consiguiente, desde hace varios años se ha emprendido una búsqueda de compuestos llamados antifolatos, los cuales interfieren estas vías a través de la inhibición de la dihidrofolato reductasa, para poder obtener y diseñar nuevas moléculas con mejores características, que los usados actualmente en terapia como son por ejemplo los agentes antibacterianos como el Trimetoprim[®], antimaláricos como Pirimetamina[®] y antitumorales como Metotrexate^{®3,4,5,6,7,8,9}.

En este trabajo 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, como una primera aproximación en la búsqueda de sustancias inhibitorias de enzimas en las esponjas marinas colombianas. *Salud UIS* 2008; 40: 157-159

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de extractos

Las muestras de las esponjas marinas congeladas se cortaron en trozos pequeños, se secaron y se sometieron a extracción con etanol de la siguiente manera: la muestra molida y pesada se extrajo exhaustivamente con etanol, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad bajo presión reducida y a 40 °C de temperatura. El residuo obtenido constituye el extracto etanólico crudo. Los extractos obtenidos se conservaron bajo refrigeración, protegidos de la luz, el aire, el calor y la humedad, hasta la preparación de las concentraciones de extracto (inhibidor), requeridas por el ensayo con la enzima⁴.

Procedimiento del ensayo de inhibición

Se utilizó un espectrofotómetro UV con termostato Cary 50 (VARIAN), la longitud de onda se fijó en 340 nm y a una temperatura de 22 °C, (programa cinético de lectura cada 15 seg en un tiempo total de 2.5 min). Se adicionó la cantidad de *buffer*

Grupo de Investigación de Productos Naturales Marinos, Departamento de Farmacia, Universidad de Antioquia.

Correspondencia: Bibiana Echavarría. Grupo de Investigación de Productos Naturales Marinos, Departamento de Farmacia, Universidad de Antioquia, calle 67 53-108 Bloque 2 laboratorio 131, Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia. E-mail: bibianae@gmail.com

de ensayo para dihidrofolato reductasa (diluido 1X) requerida en cada uno de los tubos. Se adicionó luego la enzima dihidrofolato reductasa (1.5×10^{-3} unidades) a cada tubo y se homogenizó. Se adicionó la cantidad requerida de inhibidor ó extracto y se homogenizó (en la determinación de la actividad la enzima, este paso fue omitido). Se transfirió el contenido del tubo que va a ser probado a una cubeta de cuarzo de 1 mL. Se agregaron 6 μ L de la solución de NADPH 10 mM (cofactor de la reacción), se cubrió la cubeta con Parafilm^R y se homogenizó. Se agregaron 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 cubrió la cubeta con Parafilm^R, se mezcló por inversión y se introdujo de inmediato al espectrofotómetro. Se leyeron las absorbancias a 340 nm cada 15 segundos en un tiempo total de 2.5 minutos^{10, 11}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los ensayos de inhibición enzimática realizados a los seis extractos etanólicos de las esponjas marinas obtenidas del Golfo de Urabá y al inhibidor patrón Metotrexate[®], se elaboraron gráficas de inhibición enzimática.

De acuerdo con la ecuación de Lineweaver-Burk¹², se obtuvieron los resultados de las constantes de inhibición (K_i) en la Tabla 1. La actividad enzimática de la dihidrofolato reductasa presentó una K_m : 1.001 mM y una $V_{m\acute{a}x}$: 0.002 UA/min.

Dichos resultados mostraron que la K_i del Metotrexate[®] es considerablemente menor que la de todos los extractos ensayados, con la excepción de la K_i obtenida para el extracto de *Xestospongia muta*, la cual resultó con un valor más alto, indicando que no presentó inhibición sobre la enzima dihidrofolato reductasa.

El extracto etanólico de *Amphimedon compressa* mostró una alta inhibición sobre la enzima dihidrofolato reductasa en comparación con todas las esponjas, siendo este valor casi el doble de algunos datos obtenidos. En orden del grado de inhibición mayor a menor le siguieron *Aplysina archeri*, *Ircinia campana*, *Svenzea zea* y *Xestospongia proxima* respectivamente.

Como se puede observar en los datos de velocidad, se ve claramente que con los extractos de las esponjas *Aplysina archeri* y *Amphimedon compressa*, no se dió una inhibición competitiva, debido a las variaciones en la velocidad, más no en el valor de K_i . Debido a esto, no pudieron ser comparadas contra el Metotrexate[®], sin embargo, los cuatro extractos restantes mostraron a su vez, al no presentar cambios significativos en la velocidad de reacción, que el tipo de inhibición es competitivo al igual que el Metotrexate[®]. La seguridad de estos datos se confirmó con los valores obtenidos en el coeficiente de relación, mostrando buena correlación entre las variables, siendo los valores de *Xestospongia muta* los únicos que ponen en duda los resultados de su rendimiento.

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

Inhibidor	$V_{m\acute{a}x}$ UA/min	K_i mM	Coficiente de correlación (r)
<i>Xestospongia muta</i>	0,0048	2,940	0,74
<i>Xestospongia proxima</i>	0,0020	1,964	0,97
<i>Svenzea zea</i>	0,0023	1,960	0,98
<i>Ircinia campana</i>	0,0021	1,785	0,96
<i>Aplysina archeri</i>	0,0012	1,047	0,99
<i>Amphimedon compressa</i>	0,0019	1,001	0,97
Metotrexate [®]	0,0020	2,740	0,94

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

Parámetro cinético	Valor
$V_{m\acute{a}x}$ UA/min	0,0020
K_m (mM)	1,001
Coficiente de correlación (r)	0,92

CONCLUSIONES

De las seis esponjas analizadas, cinco de sus extractos presentaron inhibición mayor que el control Metotrexate® sobre la enzima dihidrofolato reductasa, lo que 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 dihidrofolato reductasa, pues pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos antitumorales.

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

REFERENCIAS

1. Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 2004, 21; p. 1 – 49.
2. Gilbert Ian H. Inhibitors of Dihydrofolate Reductase in Leishmania and Trypanosomes. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2002; 1587: 249– 57.
3. Kompis IM, Islam K, Then RL. DNA and RNA synthesis: antifolates. *Chem. Rev* 2005; 105(2): 593-620.
4. Galeano E, Martinez A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Medicale* 2007; 17: 21- 4.
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: 5712-19.
6. Gorshkova Irina A, Gorshkov Boris A, Fedoreev Sergey A, Stonik Valentin. Halenaquinol, 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): 531-40.
7. Rao KV, Donia MS, Peng J, Garcia-Palomero E, Alonso D, Martinez 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- 40.
8. Hanessian S, Del Valle J. Total Synthesis and Structural Confirmation of Chlorodysinosin-A. *J. Am. Chem. Soc* 2007; 8: 2733- 8.
9. Cichewicz Robert H, Clifford Laura J, Lassen Peter R, Xiaolin Cao, Freedman Teresa B, Nafie Laurence A, 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): 5600-12.
10. Pez Didier, Leal Isabel. 2,4-Diaminopyrimidines as Inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal Dihydrofolate Reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003; 11: 4693 –711.
11. SIGMA-ALDRICH. Dihydrofolate Reductase Assay Kit. TECHNICAL BULLETIN. p 1-4.
12. Murray K, Robert. et al. (1994) *Bioquímica de Harper*. En: Rodwell W. Capítulo 9. Enzimas: Cinética. 13 Ed. El Manual Moderno S.A. México D.F. p 98-9.