

Homenaje a Alicia Seldes

La búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos a partir de corales, tunicados y esponjas marinas

Jorge A. Palermo*

INTRODUCCIÓN

La naturaleza despliega ante nosotros un poderoso arsenal químico, el cual permanece mayormente inadvertido, pero que se manifiesta en las interacciones entre diferentes especies o entre individuos de una misma especie. Los organismos (plantas, insectos) necesitan defenderse de microorganismos y de otros organismos predadores o competidores, y en muchos casos recurren a compuestos químicos específicamente diseñados para tales fines: los "metabolitos secundarios" o "productos naturales", como más comúnmente se los conoce. Desde la antigüedad, el hombre ha venido utilizando los productos naturales principalmente de plantas terrestres, con fines terapéuticos (medicina tradicional) o de defensa (venenos y toxinas). Este conocimiento derivó en el estudio sistemático de los productos naturales de plantas y al nacimiento de las disciplinas conocidas como farmacognosia y fitoquímica.

A pesar de los grandes avances en el área de la química combinatoria, la mayor parte de las drogas medicinales actualmente en uso siguen siendo productos naturales o análogos basados en ellos. Esto es debido a

Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Ciudad Universitaria, Pabellón 2 (1428) Buenos Aires, Argentina
E-mail: palermo@qo.fcen.uba.ar

la enorme diversidad estructural de los productos naturales y a que son naturalmente biosintetizados en forma esteroespecífica, lo cual les confiere propiedades estructurales únicas. Esta diversidad estructural de sustancias es uno de los requerimientos principales para lo que se conoce como "drug discovery". El desarrollo de bioensayos automatizados agilizó el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos a partir de extractos crudos, y revitalizó la búsqueda de nuevas drogas terapéuticas en la naturaleza. La importancia de los productos naturales como compuestos "cabeza de serie" ha sido cabalmente comprendida por los laboratorios medicinales, lo cual ha promovido un renovado interés por la preservación de los recursos naturales especialmente en países en vías de desarrollo. Paralelamente, esto ha traído como consecuencia el desarrollo de nuevos institutos y programas de investigación tanto estatales como privados, con el fin de explorar la "biodiversidad química".

A lo largo de los años, la diversidad estructural en los productos naturales aislados de plantas terrestres ha comenzado a disminuir, principalmente debido a que esta disciplina ya acumula dos siglos de trabajo, y a que la quimiotaxonomía vuelve predecible en muchos casos el tipo estructural de compuestos que puedan ser aislados de una cierta especie. Esto trae como consecuencia que se sigan aislando compuestos "nuevos" pero no "novedosos", es decir, los compues-

tos nuevos que se aíslan suelen ser variantes de estructuras ya conocidas.

Frente a esto, el ámbito marino, y en especial los invertebrados bentónicos (del fondo marino) ofrecen una fuente aun poco explotada de biodiversidad química. Estos organismos compiten por el espacio (sustratos sólidos), la luz y los nutrientes. Además deben defenderse de microorganismos patógenos y de posibles predadores. Los invertebrados marinos, en particular las esponjas, tunicados y celenterados, carecen de sistema inmunológico, y por lo tanto deben biosintetizar o incorporar con la dieta sus propias armas químicas (compuestos con actividad antibiótica, antifúngica o antiviral) de defensa que les permitan sobrevivir en ecosistemas tan competitivos. Para poder competir por el sustrato deben producir compuestos tóxicos frente a un potencial competidor (que posee células que se reproducen rápidamente). Por este motivo no es sorprendente que muchos productos naturales marinos posean potente actividad antitumoral.

La característica más notable de los productos naturales marinos, y que los vuelve potencialmente interesantes para su estudio, es que son estructuralmente muy diferentes a los metabolitos secundarios aislados de fuentes terrestres. De hecho no es infrecuente el aislamiento de compuestos con esqueleto carbonado novedoso y/o con grupos funcionales poco frecuentes. Esta

diversidad estructural les confiere un enorme potencial como compuestos cabeza de serie en programas de muestreo biomédico. De hecho, algunos productos naturales marinos, como la bryostatina 1 y la dehidrodidemina B, ya se encuentran en estudios de fase III como antitumorales en humanos, y próximos a llegar al mercado. Existen numerosos ejemplos de productos marinos en fase II, lo cual demuestra el inmenso potencial de este recurso.

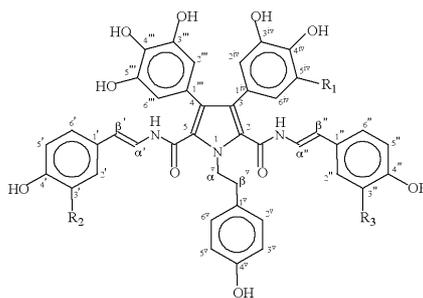
Nuestro país posee más de 3000 km de ecosistemas costeros (sin contar la Antártida), los cuales han sido poco estudiados tanto biológica como químicamente. La Dra. Alicia Selde comenzó en la década del 80 con el estudio de los productos naturales marinos en nuestro país y su trabajo resultó fundamental para el desarrollo de esta disciplina en Argentina dando origen a tres grupos de investigación actualmente activos en esta área. En las páginas subsiguientes pasaré a relatar algunos descubrimientos que hemos realizado con mi grupo de investigación particularmente en el área de los productos naturales de esponjas, tunicados y corales.

En el área de productos naturales marinos, debido a las características de la disciplina, la metodología y la productividad son muy diferentes a las del área más tradicional de productos naturales de plantas. En general en los invertebrados marinos (particularmente en esponjas y tunicados) la mayor parte de las muestras no son bioactivas o no producen metabolitos secundarios. Esto es muy diferente en las plantas ya que prácticamente cualquier tipo de vegetal terrestre produce algún tipo de metabolito secundario (triterpenos, flavonoides, etc). En general se considera que en invertebrados marinos apenas el 5 % de las muestras suelen presentar bioactividad o riqueza química. Esta es la causa principal por la cual muchos grupos tradicionales en otros países latinoamericanos hicieron intentos de pasar "de la tierra al mar" y desistieron. Otro problema es que en general al ser moléculas en muchos casos totalmente novedosas y además no existir un conocimiento quimiotaxonómico previo (debido en muchos casos a que no se cuenta con una taxonomía certera en invertebrados marinos) uno se encuentra cada vez con proble-

mas totalmente diferentes. Esto trae aparejado que el proceso de elucidación estructural se vuelva mucho más lento. Afortunadamente estas dificultades mencionadas suelen estar compensadas por la novedad estructural o la bioactividad de las pocas muestras marinas que valen la pena.

ESPONJAS MARINAS

Nuestro primer éxito con esponjas marinas fue el aislamiento de las storniamidas una familia de alcaloides producidos por una esponja del género *Cliona* colectada en la zona intermareal en San Antonio Oeste, Río Negro [1]. El nombre de las storniamidas proviene del instituto de biología marina y pesquera "Almirante Storni" que sirvió de base para nuestros viajes de campaña en la localidad.

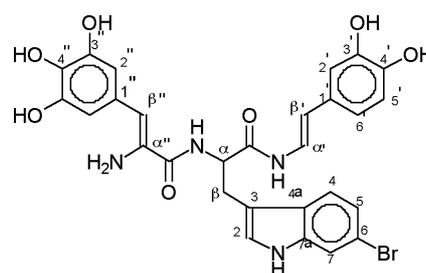


Storniamidas : R_1 , R_2 y R_3 : H u OH

Las storniamidas presentan un esqueleto formado por cinco unidades de tirosina, tres de las cuales se ensamblan para formar un anillo pirrólico central, y los diferentes compuestos se distinguen por el diferente grado de hidroxilación en los anillos aromáticos. Las storniamidas mostraron actividad frente a diferentes líneas celulares de tumores sólidos.

De otra especie de esponja perteneciente al mismo género, *Cliona chilensis*, colectada mediante buceo en Rada Tilly, Chubut, se aisló un nuevo alcaloide peptídico, la celenamida E [2]. Las esponjas del género *Cliona* se caracterizan por horadar sustratos calcáreos como rocas, valvas de moluscos, arrecifes de coral, etc. Esta habilidad es debida a la presencia de enzimas específicas capaces de disolver el carbonato de calcio de los sustratos. En las pesquerías de ostras

son consideradas una plaga porque producen fragilidad en las valvas de los moluscos, con las consiguiente pérdidas económicas, y en ciertas regiones del mundo, estas esponjas representan una amenaza para los arrecifes de coral. Casualmente, las esponjas del género *Cliona* suelen producir compuestos fenólicos, y se cree que estos metabolitos secundarios intervienen en el proceso de ataque a los sustratos calcáreos, ayudando a complejar el calcio.

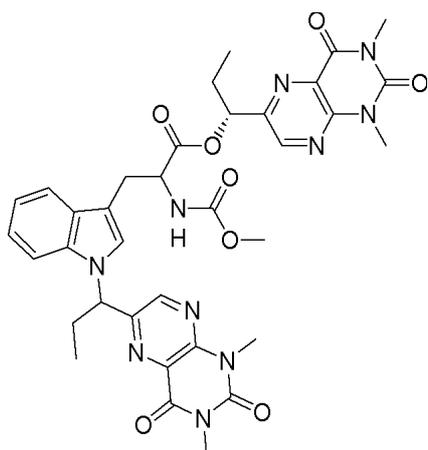


Celenamida E

Entre los distintos métodos para colectar este tipo de organismos, generalmente se emplea el buceo, el snorkel, o la colecta a mano durante la marea baja. Sin embargo estas técnicas sólo brindan acceso a las muestras que se encuentran a poca profundidad. Para acceder a la biodiversidad que se encuentra a profundidades mayores se hace necesario recurrir al uso de redes de profundidad o de rastras. Con la colaboración de personal del Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP, Mar del Plata) se logró acceder a colecciones de la llamada "fauna acompañante" de las operaciones de pesca de vieyras. Dicho material fue recolectado a más de 100 m de profundidad y por lo tanto se trata de especies a las que no se puede acceder por otros medios de colecta.

Una especie particularmente abundante fue una esponja *Clathria sp.* De la cual se pudo aislar las pseudoanchynazinas, una serie de alcaloides derivados de triptofano y pteridina de estructura novedosa [3]. Como característica estructural notable, en estos compuestos el grupo amino del triptofano se encuentra bloqueado con metil carbamato.

Es muy posible que estos compuestos constituyan algún medio de defensa para la esponja (probablemente impidiendo el asentamiento de larvas de otras especies) ya que esta los produce en gran cantidad,



Pseudoanchynazina B

sin embargo, sorprendentemente, las pseudoanchynazinas no presentaron actividad farmacológica de interés.

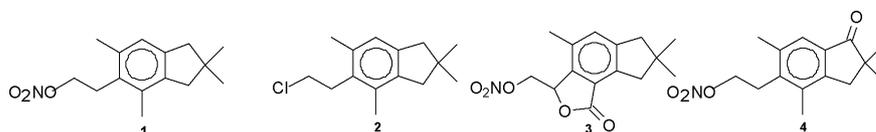
CORALES BLANDOS (OCTOCORALES)

La pesca en los mares antárticos se encuentra monitoreada por un organismo multinacional (CAMELAR) que periódicamente realiza campañas de muestreo para la evaluación del estado del recurso pesquero, en particular la merluza negra. Una de esas campañas, realizada por el navío *BIP Dr. E. Holmberg* del INIDEP nos permitió acceder a dos de las muestras más fascinantes en cuanto a la estructura y bioactividad de los metabolitos secundarios. El control del estado de las pesquerías se realiza, precisamente, pescando con redes de profundidad. Según la velocidad del buque, estas redes pueden arrastrarse por el fondo, llevando consigo también una gran cantidad de organismos bntónicos. Esta campaña, realizada alrededor de las islas Georgias del Sur, permitió la recolección de una buena cantidad de muestras de invertebrados.

Una de las muestras más importantes en cuanto a su cantidad, fue el octocoral *Alcyonium paessleri*, una de las especies de corales blandos más abundantes en los mares antárticos, colectado a 200m de profundidad. De dicha especie se pudieron aislar las alcyopterosinas, una familia de sesquiterpenoides novedosos (varios de ellos clorados) con el raro esqueleto de iludalano, pero lo más sorprendente fue la presencia

de un grupo nitrato como sustituyente en varios de estos compuestos [4]. Si bien los nitratos son nutrientes abundantes en el agua de mar, nunca se lo había detectado como sustituyente incorporado a un pro-

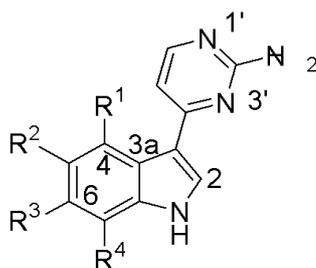
una buena actividad frente a distintas líneas celulares de tumores sólidos, y además se observó que producían apoptosis (muerte celular programada). Estos resultados nos llevaron a emprender distintos proyectos

Algunas alcyopterosinas aisladas del octocoral *Alcyonium paessleri*.

ducto natural. De hecho, estos compuestos resultaron ser los primeros nitratos naturales en ser completamente aislados y caracterizados. Varios de estos compuestos presentaron actividad antitumoral.

TUNICADOS

En la colección proveniente de las islas Georgias, la muestra más interesante desde el punto de vista de la bioactividad resultó el tunicado *Aplidium meridianum*. Dicho tunicado, de un color amarillo verdoso intenso, nos brindó una familia de alcaloides indólicos, las meridianinas, varias de las cuales presentaron promisoría actividad antitumoral [5].



- 1 $R^1 = OH; R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 2 $R^1 = OH; R^2 = R^4 = H; R^3 = Br$
- 3 $R^1 = R^3 = R^4 = H; R^2 = Br$
- 4 $R^1 = R^2 = R^4 = H; R^3 = Br$
- 5 $R^1 = OH; R^2 = R^3 = H; R^4 = Br$

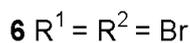
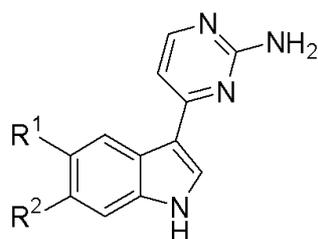
meridianinas A-E

Dichos compuestos poseían en común un anillo de 2-aminopirimidina unido al C-3 de un indol, y el anillo indólico podía encontrarse bromado y/o hidroxilado. Estudios preliminares de estos compuestos indicaron

relacionados con las meridianinas. Por un lado, se estableció un convenio con el laboratorio del Dr. Laurent Meijer (CNRS Roscoff-Francia) con el fin de evaluar la actividad de las meridianinas como inhibidoras de protein-quinasas. Por otro lado comenzamos un proyecto de síntesis de análogos de meridianinas con el fin de obtener derivados con mayor actividad y menor toxicidad. Además se comenzó a trabajar en el desarrollo de metodologías para el análisis y cuantificación de meridianinas en fluidos biológicos.

Fue precisamente esta última línea de trabajo la que condujo al descubrimiento de dos nuevas meridianinas. Al analizar los espectros de masa de las diferentes meridianinas se observó que todas presentaban una pérdida de 41 unidades de masa a partir del ion molecular. Dicha pérdida neutra (probablemente azirina) nos dio la idea de emplear espectrometría de masa tándem como método de análisis y cuantificación de este tipo de compuestos. Para probar la técnica utilizamos un nuevo batch de extracto crudo de *A. meridianum* colectado en las islas Georgias del Sur pero en una campaña posterior. Para nuestra sorpresa, detectamos, además de las meridianinas previamente aisladas, otros dos compuestos que no habíamos observado en el extracto del año anterior. Dichos compuestos fueron posteriormente aislados y caracterizados como meridianinas F y G [6].

Nuestro proyecto de síntesis de análogos nos llevó a preparar, mediante una síntesis de Fischer con uso de microondas, una serie de compuestos con el anillo de 2-aminopirimidina unido al C-2 del indol. Dichos derivados no resultaron bioactivos [7].



meridianinas F-G

Las pruebas de actividad realizadas en Francia mostraron que las meridianinas eran potentes inhibidores selectivos de varias protein-quinasas dependientes de ciclina (CDKs) [8]. Existe un gran número de CDKs y su función es promover la división celular en su forma fosforilada. La CDK se une al ATP y luego fosforila la proeína de retinoblastoma Rb. Esta proteína en su forma no fosforilada actúa como un freno a la división celular. Por lo tanto las diferentes CDKs son un objetivo para nuevas drogas antitumorales, donde el efecto buscado es inhibir la fosforilación de Rb. Esto conduce al proceso llamado apoptosis o muerte celular programada. Las CDKs son también importantes en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el mal de Alzheimer, lo cual las vuelve blancos aun más atractivos para la búsqueda y diseño de inhibidores específicos.

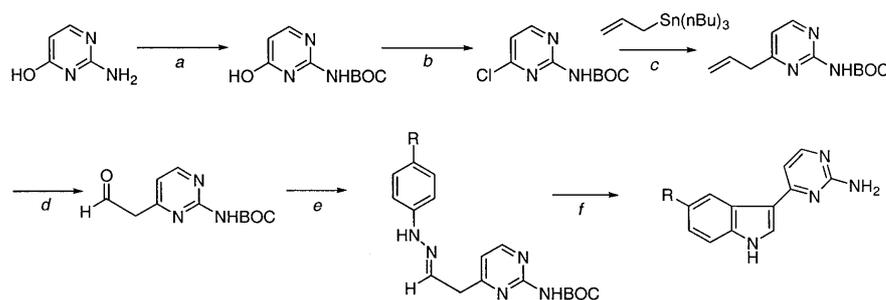
Estos resultados nos llevaron a presentar una patente provisional conjunta en EEUU entre el CNRS y la UBA, pero lamentablemente no se pudo obtener la patente definitiva debido a la existencia de otra patente anterior. En dicha patente se protegía todo tipo de pirimidinas 2,4 disustituídas como inhibidores de protein-quinasas, y lamentablemente las meridianinas quedaban automáticamente protegidas, por más que no eran el objetivo de la misma. La existencia de dicha patente nos llevó a cancelar el proyecto, pero por otro lado nos quedó la satisfacción de saber que estuvimos a punto (la patente llevaba menos de un año de publicada) de completar el ciclo de desarrollo de un producto natural: aislamiento, elucidación estructural, pruebas de actividad, patentamiento, síntesis de análogos.

CONCLUSIONES

Como queda demostrado con los resultados expuestos, nuestros mares son una fuente invaluable de potenciales descubrimientos en el área de productos naturales bioactivos y la farmacognosia. Su importancia es aun mayor si consideramos la vastedad del mismo, y que recién hemos comenzado a explorarlo químicamente, con lo cual es posible augurar un futuro promisorio a la disciplina, y el descubrimiento de nuevas sustancias que acaparen nuestro interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. A. Palermo, M. F. Rodríguez Brasco, A. Seldes, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2727-2734.
- [2] J. Palermo, M. F. Rodríguez Brasco, A. Seldes, V. Balzaretto, E. Cabezas, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 488-490.
- [3] I. A. Zuleta, M. L. Vitelli, R. Baggio, M. T. Garland, A. M. Seldes y J. A. Palermo, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4481-4486.
- [4] J. A. Palermo, M. F. Rodríguez Brasco, C. Spagnuolo, E. Bal de Kier Joffé, L. Puricelli, A. M. Seldes, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4482-4486.
- [5] L. Hernandez Franco, E. Bal de Kier Joffe, Lydia Puricelli, A. Seldes, J. Palermo, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1130-1132.
- [6] A. M. Seldes, M. F. Rodríguez Brasco, L. Hernández Franco, J. A. Palermo *Nat. Prod. Res.* **2006**, em prensa.
- [7] L. Hernandez Franco, J. A. Palermo, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 975-977.
- [8] M. Gompel, M. Leost, E. Bal de Kier Joffé, L. Puricelli, L. Hernández Franco, J. Palermo, L. Meijer *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1703 - 1707.



a. $(t\text{-BuCO}_2)_2\text{O}$, py, 85 °C b. POCl_3 , N,N-dimethylaniline, CH_2Cl_2 , r.t. c. $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$, LiCl, THF, reflux d. KIO₄, KMnO₄, iprOH e. Phenylhydrazine hydrochloride, NaAcO, MeOH f. ZnCl_2 , DMF, microwave

Síntesis de Isomeridianinas

Tabla 1. Efecto de las meridianinas sobre CDK (DC_{50} , concentración micromolar)

quinasa	A	B	C	D	E
CDK1/ciclina B	2.50	1.50	3.00	13	0.18
CDK2/ciclina A	—	—	—	—	0.80
CDK5/p35	3.00	1.00	6.00	5.50	0.15
PK dependiente de AMP cíclico	—	0.08	0.70	1.00	0.09
PK dependiente de GMP cíclico	—	0.08	0.40	0.80	0.60
GSK3- β	1.30	0.50	2.00	2.50	2.50
Casein quinasa 1 (péptido)	—	1.00	30	100	0.40
Casein quinasa 1 (caseína)	—	2.00	>100	>100	1.00