

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento

Evaluación de un conjunto de cumarinas candidatas a inhibidoras de enzimas fosfolipasas A₂ (EC 3.1.1.4) de venenos totales de serpientes.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento.

Autor:

Geovanny Patricio Barrera Luna

CI: 0105510960

Correo electrónico: bqfgeovannybarrera@gmail.com

Directora:

María Elena Cazar Ramírez, PhD

CI: 0602243800

Cuenca, Ecuador

18 de noviembre de 2022

Resumen

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) hidrolizan fosfolípidos de membrana, liberando ácidos grasos de cadena larga, pero principalmente, ácido araquidónico (ARA), un precursor de formación de las prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT) (eicosanoides proinflamatorios). Un posible e interesante tratamiento antiinflamatorio podría estar asociado al desarrollo de fármacos antiinflamatorios eficaces en inhibir selectivamente las PLA₂, lo que evitaría la liberación de ARA y, por consecuencia, formación de PG y LT.

Objetivo:

Evaluar, “*in vitro*”, la actividad de un conjunto de cumarinas potencialmente inhibitoras de fosfolipasas A₂ secretadas en los venenos de serpientes (sPLA₂) y, a partir de estas evaluaciones, analizar la estructura química de esas moléculas para entender su actividad enzimática anti PLA₂.

Metodología:

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de compuestos que han reportado actividad inhibitoria frente a enzimas sPLA₂ ya sea a nivel experimental y/o teórico.

Diez derivados cumarínicos sintetizados por el grupo de síntesis orgánica, liderado por el Prof. Dr. Eugenio Uriarte Villares y sus colaboradores, de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), fueron evaluados en su actividad anti fosfolipídica.

La actividad anti fosfolipídica de venenos ofídicos se evaluó por el método del ácido N-octanoil benzoico (NOBA).

Resultados:

Las estructuras del conjunto de cumarinas evaluados en este estudio se mostraron eficientes en la inhibición de las actividades fosfolipídicas de sPLA₂ en los venenos totales de varias especies de serpientes.

Palabras clave: Cumarinas. Fosfolipasas A₂. In Vitro. Venenos de serpientes.

Abstract

Phospholipases A₂ (PLA₂) hydrolyze membrane phospholipids, releasing long-chain fatty acids, but mainly arachidonic acid (ARA), a precursor to the formation of prostaglandins (PG) and leukotrienes (LT) (pro-inflammatory eicosanoids). A possible and interesting anti-inflammatory treatment could be associated with the development of effective anti-inflammatory drugs in selectively inhibiting PLA₂, which would prevent the release of AA and, consequently, the formation of PG and LT.

Objective:

To evaluate, "in vitro", the activity of a set of coumarins that are potentially inhibitory to phospholipase A₂ secreted in snake venoms (sPLA₂) and, based on these evaluations, to analyze the chemical structure of these molecules to understand their anti-PLA₂ enzymatic activity.

Methodology:

A bibliographic search was carried out for compounds that have reported inhibitory activity against sPLA₂ enzymes, either at an experimental and / or theoretical level.

Ten coumarin derivatives synthesized by the organic synthesis group, led by Prof. Dr. Eugenio Uriarte Villares and his collaborators, from the University of Santiago de Compostela (USC), were evaluated for their anti-phospholipid activity.

The anti-phospholipid activity of ophidian poisons was evaluated by the N-octanoyl benzoic acid (NOBA) method.

Results:

The structures of the coumarin set evaluated in this study were efficient in inhibiting the phospholipidic activities of sPLA₂ in the total venoms of various species of snakes.

Keywords: Coumarins. Phospholipase A₂. In Vitro, Snake Venoms.

Índice del trabajo

Evaluación de un conjunto de cumarinas candidatas a inhibidoras de enzimas fosfolipasas A₂ (EC 3.1.1.4) de venenos totales de serpientes.....	9
1. Introducción.....	9
2. Materiales y métodos	25
2.1 Búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad enzimática anti PLA₂.....	25
2.2 Evaluación “in vitro” de la actividad anti PLA₂.....	25
2.3 Evaluación de las características estructurales de las cumarinas activas anti sPLA₂	28
3. Resultados y Discusión:	28
3.1 Búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad enzimática inhibitoria de sPLA₂	28
3.2 Evaluación de la actividad sPLA₂:.....	28
3.3 Evaluación de características estructurales de las cumarinas sintéticas con actividad anti sPLA₂ del estudio.....	34
4. Conclusiones:	37
5. Agradecimientos	38
6. Referencias	38
7. Anexos	46
Anexo 1. Búsqueda bibliográfica de moléculas con actividad inhibitoria frente a sPLA₂.....	46
Anexo 2. Moléculas representativas clasificadas en productos naturales y sintéticos con actividad inhibitoria frente a sPLA₂ recopiladas de la literatura	71
Anexo 3. Efectos tóxicos de los venenos de serpientes	82
Anexo 4. Imágenes ilustrativas de especies de cada familia del estudio	83

Índice de figuras

Figura 1. Sitios de hidrólisis de fosfolipasas.....	9
Figura 2. Imágenes en 3D de (A) PLA ₂ IA y (B) PLA ₂ IB.....	10
Figura 3. Cascada del ARA por acción de las COX y 5-LO, y enfermedades relacionadas con la formación de eicosanoides proinflamatorios.....	11
Figura 4. Regulación de la expresión de fosfolipasas A2 secretadas (sPLA ₂) por señalización celular y regulación génica.	12
Figura 5. Enfermedades asociadas a la desregulación de las PLA ₂	13
Figura 6. Fosfolipasa A ₂ GIA del veneno de Naja naja	19
Figura 7. Fosfolipasa A ₂ GIIA del veneno de Vipera ammodytes ammodytes.....	20
Figura 8. Actividad catalítica de enzimas sPLA ₂	21
Figura 9. (A) Estructura general de las cumarinas, (B) Estructura general de los flavonoides.	23
Figura 10. Rutas para la síntesis de cumarinas.....	27
Figura 11. Estructura general del grupo IA sPLA ₂	30
Figura 12. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA ₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA ₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 1.	31
Figura 13. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA ₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA ₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 2.	32
Figura 14. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA ₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA ₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 3.	32
Figura 15. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA ₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA ₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 4.	33
Figura 16. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA ₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA ₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 5.	33

Figura 17. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA ₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA ₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 6.	34
Figura 18. Relación estructura-función entre regiones moleculares de Rhm y sus actividades.	35
Figura 19. Estructura básica cumarina C1–C4 con actividad anti sPLA ₂ del estudio	36
Figura 20. Estructura básica cumarina C5 – C6	37
Figura 21. Estructura básica cumarinas C1 – C6	37
Figura 22. Estructura básica cumarinas C7 – C10	37

Índice de tablas

Tabla 1. Nuevos inhibidores de PLA ₂ testeados en ensayos clínicos	15
Tabla 2. Superfamilia Fosfolipasas A ₂	17
Tabla 3. Estructura tridimensional y secuencias de las PLA ₂	18
Tabla 4. Inhibidores de las fosfolipasas A ₂ o PLA ₂ derivadas de veneno animal con actividad antinociceptiva	22
Tabla 5. Resultados de actividad anti sPLA ₂	29
Tabla 6. Sustituyentes cumarinas C1–C4 con actividad anti sPLA ₂ del estudio. ...	36
Tabla 7. Sustituyentes cumarinas C5 – C6.....	37

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Geovanny Patricio Barrera Luna en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de un conjunto de cumarinas candidatas a inhibidoras de enzimas fosfolipasas A2 (EC 3.1.1.4) de venenos totales de serpientes", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 18 de noviembre de 2022



Geovanny Patricio Barrera Luna

C.I: 0105510960

Cláusula de Propiedad Intelectual

Geovanny Patricio Barrera Luna, autor del trabajo de titulación "Evaluación de un conjunto de cumarinas candidatas a inhibidoras de enzimas fosfolipasas A2 (EC 3.1.1.4) de venenos totales de serpientes", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 18 de noviembre de 2022



Geovanny Patricio Barrera Luna

C.I: 0105510960

Evaluación de un conjunto de cumarinas candidatas a inhibidoras de enzimas fosfolipasas A₂ (EC 3.1.1.4) de venenos totales de serpientes

Geovanny Barrera-Luna¹, María-Elena Cazar¹, Nardy Diez², Saulo L. da Silva¹
¹ Universidad de Cuenca

Universidad de Cuenca, geovannyp.barreal@ucuenca.edu.ec

Universidad de Cuenca, maría.cazar@ucuenca.edu.ec

Universidad de Cuenca, saulo.da.silva@ucuenca.edu.ec

² Escuela Superior Politécnica del Litoral

Escuela Superior Politécnica del Litoral, ndiez@espol.edu.ec

1. Introducción

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas que hidrolizan los fosfolípidos. Hay cinco tipos básicos de fosfolipasas, A₁ (EC 3.1.1.32), A₂ (EC 3.1.1.4), B (EC 3.1.1.5), C (EC 3.1.4.10) y D (EC 3.1.4.4), que se clasifican según los sitios de su escisión en sustratos de fosfolípidos. Las fosfolipasas A (PLA) son acil hidrolasas clasificadas según su hidrólisis del éster 1-acílico (PLA₁) o del éster 2-acílico (PLA₂). Las fosfolipasas que hidrolizan ambos grupos acilo se denominan fosfolipasa B (PLB). La escisión del enlace glicerofosfato es catalizada por la fosfolipasa C (PLC), mientras que la eliminación del grupo base es catalizada por la fosfolipasa D (PLD), como se observa en la *Figura 1*. Por tanto, la PLC y la PLD son fosfodiesterasas (Xuemin, 2018).

Phospholipases

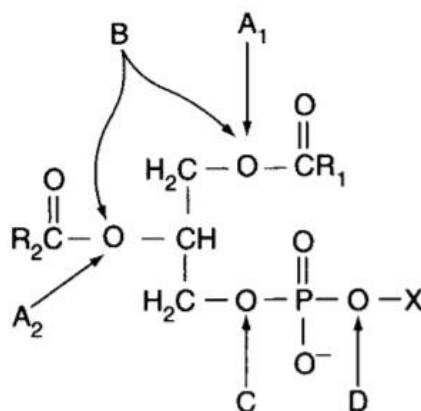


Figura 1. Sitios de hidrólisis de fosfolipasas

Nota. Tomada de *Phospholipases* por Wilton, 2008, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, p. 307. (<https://doi.org/10.1016/B978-044453219-0.50013-1>). Copyright © 2008 Elsevier BV Todos los derechos reservados.

Los venenos animales son materiales derivados de procesos asociados a adaptaciones evolutivas compuestas por mezclas de sustancias producidos para ayudar en la caza y protección de esos animales. Los venenos son ricos en moléculas biológicamente activas como, por ejemplo, proteínas (con y sin actividad enzimática), péptidos, aminas biogénicas y otras, que poseen alta especificidad por una variedad de dianas específicas lo que afecta la fisiología orgánica y, por tanto, la homeostasis celular. (Harvey, 2014; Utkin, 2015).

En los venenos de serpientes, alrededor de 90% de sus componentes son de origen proteica (Tasoulis & Isbister, 2017) y las PLA₂ (EC 3.1.1.4) observadas en la *Figura 2*, son una de las principales clases de enzimas y que aparecen entre las de mayor porcentaje. Tales enzimas hidrolizan el enlace éster 2-acílico de los fosfolípidos de membrana liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres como, por ejemplo, ácidos araquidónico u oleico (Calvete, 2013; Dennis et al., 2011; Filkin et al., 2020).

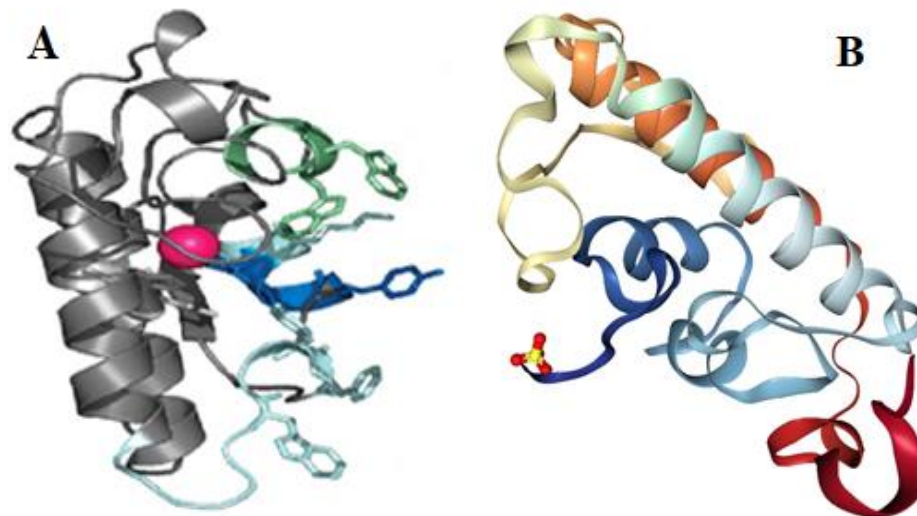


Figura 2. Imágenes en 3D de (A) PLA₂ IA y (B) PLA₂ IB

Nota. Figura 2A: Tomada de Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling por Burke, J., & Dennis, E., 1986. *Journal of Lipid Research*, 50, p. S238. (<https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>). Derechos reservados © 2009 ASBMB.

Figura 2B: Tomada de Pancreatic Phospholipase A2: Isolation of the Human Gene and cDNAs from Porcine Pancreas and Human Lung por Seilhamer, 2009. *DNA*, 5(6), p. 520. (<https://doi.org/10.1089/dna.1.1986.5.519>). Derechos reservados Mary Ann Liebert, Inc., Publishers

Las PLA₂ hidrolizan fosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidónico (ARA), un precursor de los eicosanoides proinflamatorios (Batsika et al., 2021; Calvete, 2013; Dennis et al., 2011). El ARA liberado se convierte en prostaglandinas (PG), prostaciclina (PC) por acción de las ciclooxygenasas (COX1 / COX2) y en leucotrienos (LT) por acción de la 5-lipoxigenasa (5-LO) como se

observa en la *Figura 3*. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben las COX1 y COX2 reduciendo la síntesis de PG y PC, pero no inhiben la acción de 5-LO (De Angelis & Tata, 2016). Así, el ARA producido mediante la acción de la 5-LO será convertido en LT, que en altas concentraciones está directamente relacionado con efectos adversos en el tracto gástrico y renal. Los investigadores estiman que, desarrollar un fármaco inhibidor selectivo de las PLA₂, podría ser una buena estrategia para evitar, no solo la formación de PG y PC, sino también la formación de LT y, así, evitar todos sus efectos secundarios pues se inhibiría el primer paso de la cascada del ARA (Sales et al., 2017)

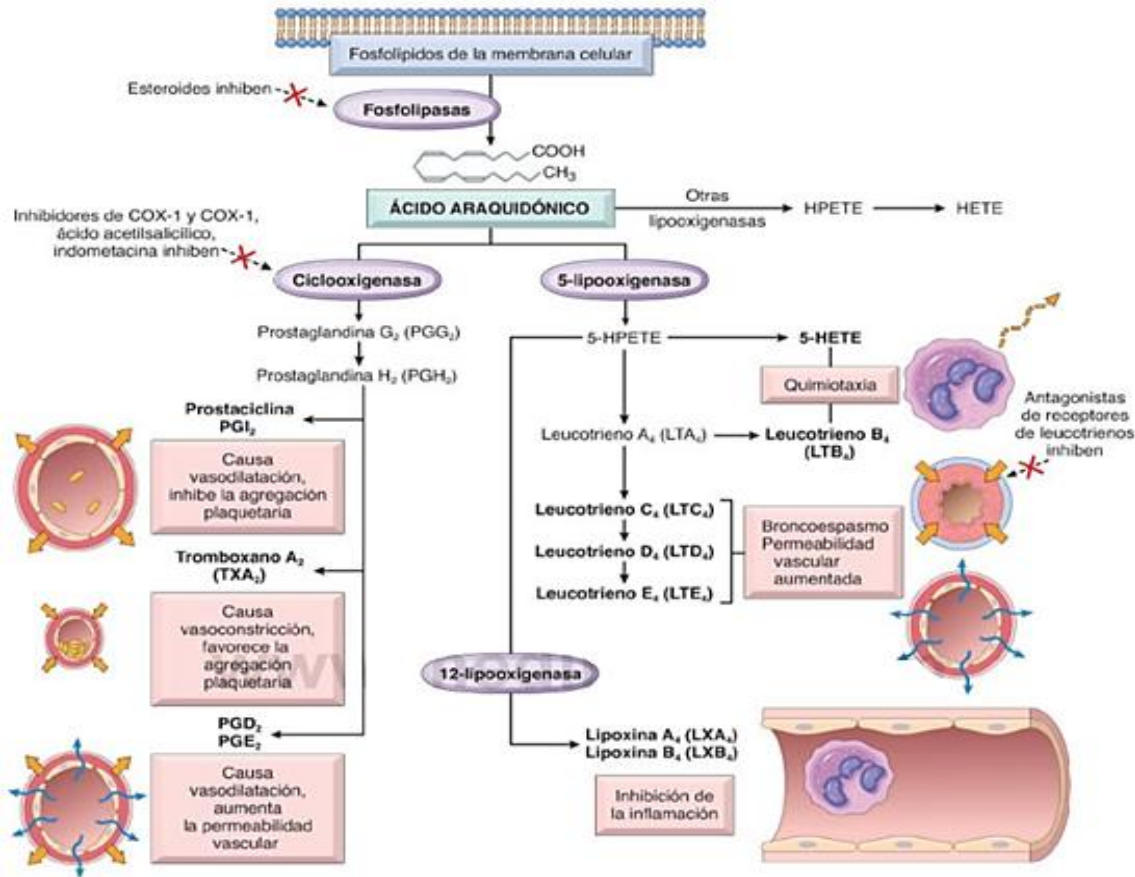


Figura 3. Cascada del ARA por acción de las COX y 5-LO, y enfermedades relacionadas con la formación de eicosanoides proinflamatorios

Nota: Tomada de Farmacología de los Eicosanoides por Terragno, et al., 2008. Farmacología de Velásquez, p. 501. Derechos reservados de la Editorial Médica Panamericana, S.A.

Los productos de degradación de la escisión de los fosfolípidos (ARA y lisofosfolípidos = LP) por sPLA₂ y fosfolipasas A₂ citosólicas (cPLA₂) pueden metabolizarse más a segundos mensajeros de señalización (Ácido lisofosfatídico = LPA, Prostaglandinas = PG, Leucotrienos = LT) para desencadenar vías de señalización celular activando receptores acoplados a proteína G (GPCR) y

receptores de citocinas. Estos eventos pueden resultar en la amplificación de la producción de citocinas proinflamatorias y la intensificación de la inflamación. La activación de factor nuclear-kappa beta (NF- κ B), proteínas de unión al potenciador CCAAT (C/EBP) y eventos epigenéticos también pueden mejorar la expresión de sPLA₂, mientras que la activación de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y linfoma de células B-6 (BCL-6) puede suprimir su expresión a nivel de ARNm (Quach et al., 2014), lo antes mencionado se visualiza en la *Figura 4*.

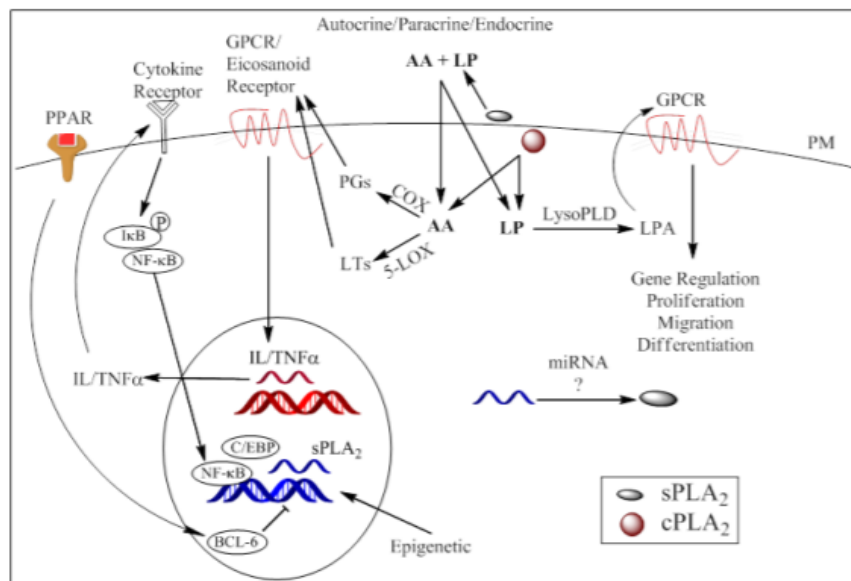


Figura 4. Regulación de la expresión de fosfolipasas A2 secretadas (sPLA₂) por señalización celular y regulación génica.

Nota. Tomada de Quach, et al., 2014. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical pharmacology*, 90(4), p. 19. (<http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.05.022>). Derechos de autor © 2014 Elsevier Inc. todos los derechos reservados.

La desregulación de la actividad enzimática de las PLA₂ conducen a la generación de ARA en diferentes tejidos afectados (cardíaco, nervioso, respiratorio, pancreático, hepático, articular, digestivo, etc.), lo cual conduce a trastornos inflamatorios como sepsis, asma, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis y muchos otros como que se observan en la *Figura 5* (Alasmarty et al., 2017). Estas patologías aumentan la expresión de las isoformas de sPLA₂, lo que aumenta la liberación de ARA a niveles tres veces mayores que los niveles basales. El ARA se puede metabolizar aún más en las células a través de las vías de la COX y la 5-LOX para producir mediadores proinflamatorios como prostaglandinas PG y LT, respectivamente. Estos mediadores pueden estimular la producción de citocinas inflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas (IL), lo que lleva a la amplificación de la señal y la intensificación del evento

inflamatorio y estrés oxidativo (Quach et al., 2014). La elevación crónica de la glucosa en sangre conduce a una mayor activación de sPLA₂, generación de ARA y eicosanoides y cardiopatía coronaria inflamatoria. Se han estudiado varias isoenzimas sPLA₂ por su implicación en la regulación de la glucosa en sangre a través de mecanismos insulino-dependientes. Estas enzimas también están involucradas en las complicaciones cardiovasculares de la diabetes (Hui, 2012). Así, la sPLA₂ del grupo IB promueve la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en ratones transgénicos que sobre expresan esta enzima. El grupo X sPLA₂ es otro regulador de la producción de insulina, donde suprime la secreción de insulina estimulada por glucosa de las células beta a través de un mecanismo dependiente de COX-2 (Shridas et al., 2014). Se encontró que los sujetos diabéticos eran más susceptibles a la lipólisis por el grupo V sPLA₂ aumentando su estado de inflamación y aumentando su riesgo de complicaciones cardiovasculares (Alasmary et al., 2017).



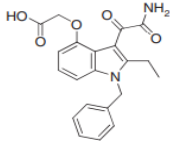
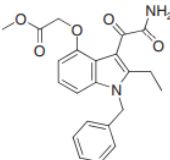
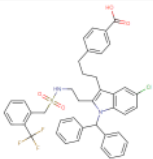
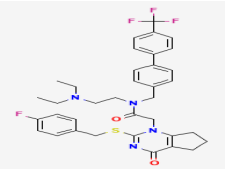
Figura 5. Enfermedades asociadas a la desregulación de las PLA₂

Nota. Esta imagen fue creada por el autor basada en la información de Pedada, et al., 2016. Synthesis of new secretory phospholipase A2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents. European journal of medicinal chemistry, 112, p. 289-297. (<http://doi.org/10.1080/14756366.2017.1363743>)

Como las PLA₂ (sPLA₂, citosólicas = cPLA₂ y lisosomales = LPLA₂) están relacionadas a diversas enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cancerígenas, respiratorias, cardíacas, infecciosas, endocrinas, entre otras; un gran número de investigadores vienen trabajando en la búsqueda y desarrollo de inhibidores de la PLA₂ como agentes terapéuticos o preventivos, tanto en enfermedades orgánicas, como tratamiento de accidentes ofídicos. Se han desarrollado nuevos inhibidores

de esta enzima y algunos de esos se han testeado en ensayos clínicos detallados en la *Tabla 1*, para diversas enfermedades inflamatorias y oncológicas (Pedada et al., 2016).

Tabla 1. Nuevos inhibidores de PLA₂ testados en ensayos clínicos

Inhibidores de PLA ₂	Estructura química	PLA ₂ inhibida	Fuente	Enfermedad	Estudio N°/ Fase de estudio clínico	Fechas del estudio
Varespladib		sPLA ₂	Natural	Intoxicación por mordedura de serpiente	NCT04996264 Fase II	2021
				Mieloma múltiple	NCT04025450 Fase I/Fase II	2019-actualmente
Metil-vaespladib		sPLA ₂	Sintético	Enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19)	NCT04969991 Fase 2	2021
				Tratamiento por mordedura de serpientes	NCT04996264 Fase 2	2021
Giripladib		cPLA ₂	Sintético	Osteoartritis	NCT00396955 Fase 1	2006-2007
				Artritis reumatoide	NCT00440492 Fase 1	2006-2007
Darapladiib		LpPLA ₂	Natural	Síndrome agudo coronario	NCT01000727 Fase 3	2009-2014

Nota. Adaptado de Pedada, et al., 2016. Synthesis of new secretory phospholipase A₂-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents. European journal of medicinal chemistry, 112, p. 289-297. (<http://doi.org/10.1080/14756366.2017.1363743>)

Por tanto, el descubrimiento de prototipos que podrían ser utilizados para producir inhibidores de PLA₂ es un tema de gran interés científico y biotecnológico, para evitar los efectos fisiopatológicos derivados de la acción de las PLA₂ sea orgánica o derivada de accidentes ofídicos.

La superfamilia de PLA₂ está conformada por 16 grupos de proteínas (I-XVI) con variada masa molecular (de 10 a 114 kDa), divididas en seis subgrupos distintos: PLA₂ secretadas (sPLA₂), PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ independientes de calcio (Ca²⁺) (iPLA₂), acetilhidrolasas PAF (PAF-AH), lisosomal (LPPLA₂) y específica del tejido adiposo (AdPLA₂) mismas que se detallan en la *Tabla 2* (Dennis et al., 2011; Filkin et al., 2020; Quach et al., 2014). Esta subdivisión está basada en su estructura, mecanismo catalítico, localización y relaciones evolutivas. Las sPLA₂ conformadas por dieciocho miembros (IA, IB, IIA-IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XIIA, XIIB, XIII y XIV), se caracterizan por tener un bajo peso molecular (14-18 kDa), estas isoformas son calcio dependientes que se activan en presencia de mili moles (mM) de este catión y actúan en la sección extracelular de la membrana celular. Las cPLA₂ conformadas por seis miembros (grupo IVA-IVF) están localizadas en el citosol y se activan en presencia de micro moles (μM) de calcio. Las iPLA₂ conformadas por seis miembros (grupo VIA-VIF) su sitio activo catalítico es similar a cPLA₂ pero no requieren de calcio para su activación, están localizadas en el citosol, el lado interno de la membrana celular en el retículo endoplasmático y en la membrana mitocondrial. Las PAF-AH, son cuatro miembros de la familia (grupo VIIA, VIIB, VIIIA y VIIIB), tres son expresadas intracelularmente y una es excretada, todos los miembros de esta familia tienen una serina catalítica y cumplen la función principal de liberar acetato de la posición sn-2 del factor activador plaquetario acetilhidrolasa, de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Las LPPLA₂ conformadas por un solo miembro (grupo XV), son glicoproteínas localizadas en el lisosoma y tiene preferencia por la catálisis en un entorno de pH ácido, es ubicua y se expresa altamente en macrófagos alveolares y juega un papel importante en el metabolismo de los tensioactivos pulmonares. Las AdPLA₂, conformadas por un solo miembro (grupo XVI), está altamente distribuida en el tejido adiposo y regulan la generación de energía al escindir los ácidos grasos de los triglicéridos (Batsika et al., 2021; Quach et al., 2014; Zhang et al., 2021).

Las sPLA₂ son pequeñas proteínas, que contienen de cinco a ocho enlaces disulfuro y clasificadas en los grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII y XIV y subgrupos A, B, C, D, E y F. Entre las PLA₂ secretadas (sPLA₂) se incluye las PLA₂ de páncreas, líquido sinovial, venenos de serpientes y abejas, que además muestran varios efectos (Dennis et al., 2011; Magrioti & Kokotos, 2013; Su & Chang, 1984) como edema, hemorragia e inhibición de la agregación plaquetaria, así como efectos neurotóxicos, anticoagulantes y miotóxicos (Da Silva et al., 2009; Xiao et al., 2017) como se muestra en el *Anexo 3*.

Tabla 2. Superfamilia Fosfolipasas A₂

Superfamilia de Fosfolipasa A₂				
TIPO	Grupo	Subgrupo	Masa molecular (kDa)	Residuos catalíticos
sPLA₂	GI	A, B	13 – 15	His/Asp
	GII	A, B, C, D, E, F	13 – 17	
	GIII		15 – 18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A, B	12 – 13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13 – 19	
cPLA₂	GIV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ε) F(ζ)	60 – 114	Ser /Asp
iPLA₂	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ) F(η)	84 – 90	Ser /Asp
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA ₂), B(PAF-AH II)	40 – 45	Ser/His/Asp
	GVIII	A(α ₁), B(α ₂), β	26 – 40	
LPLA₂	GXV		45	Ser/His/Asp
AdPLA₂	GXVI		18	His/Cys

Nota. Adaptado de Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention por Dennis et al., 2011, Chemical Reviews, 111(10), p. 6132. (<http://doi.org/10.1021/cr200085w>) Derechos de autor © 2011 American Chemical Society.

Las PLA₂ de veneno (sPLA₂) presentes en las serpientes de las especies de cada familia se observan en la Anexo 4 y están clasificadas en el Grupo I (IA/IB) (especies de la familia *Elapidae*) y Grupo II (IIA/IIB) (especies de las familias *Viperidae*, *Crotalidae* y *Bitis*) cuyas figuras y secuencias se encuentran en la Tabla 3. Esta clasificación se basa en la similitud de secuencia, la posición de los enlaces disulfuro y las inserciones de bucles. Las sPLA₂ de serpiente son clasificadas en los grupos IA y IIA tienen siete enlaces disulfuro: seis de ellos se conservan en las familias *Elapidae* y *Viperidae*, mientras que los enlaces disulfuro Cys11 / Cys77 y Cys51 / Cys133 solo se encuentran, respectivamente, en las familias *Elapidae* y *Viperidae*. Las sPLA₂ del grupo IIB, presentes en la familia *Crotalidae* y *Bitis*, tienen solo seis enlaces disulfuro, sin el enlace Cys61 / Cys95. Estas enzimas sPLA₂ y sus grupos IA y II (IIA y IIB) tiene un sitio catalítico formado por His/Asp y requiere de calcio (Ca²⁺) para la actividad catalítica, es decir son calcio dependientes (Dennis et al., 2011; Xiao et al., 2017), se observa su acción catalítica ejemplificada en la Figura 8.

Tabla 3. Estructura tridimensional y secuencias de las PLA₂

Fosfolipasa A₂ GIA del veneno de <i>Naja naja</i>					
Secuencia:					
10	20	30	40	50	
NLYQFKNMIK CTVPSRSWWD FADYGCYCGR GSGTPVDDL DRCCQVHDNC					
60	70	80	90	100	
YNEAEKISGC WPYFKTYSYE CSQGLTCKG DNNACAASVC DCDRLAICF					
110					
AGAPYNDNNY NIDLKARCQ					
Fuente: UniprotKB. (2021, 2 junio). Acidic phospholipase A2-2-Naja naja (Indian cobra). Uniprot. https://www.uniprot.org/uniprot/P15445					

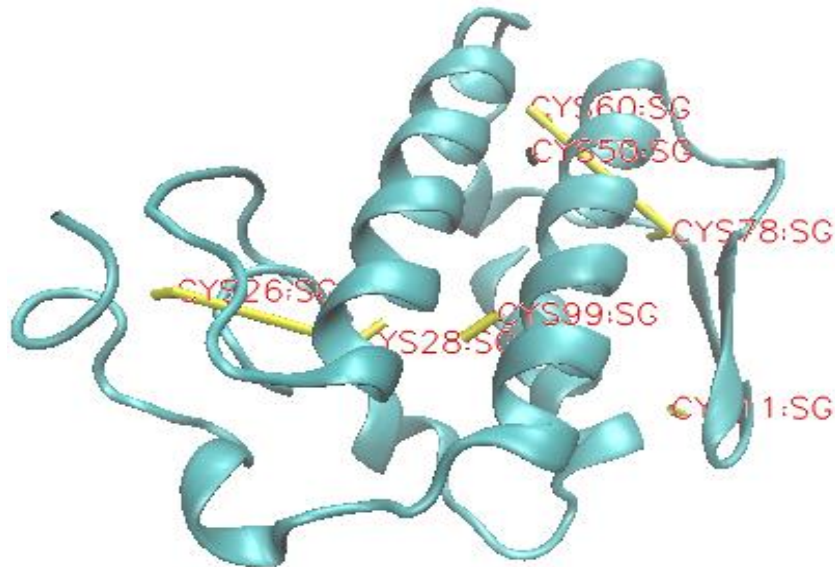


Figura 6. Fosfolipasa A2 GIA del veneno de *Naja naja*

Nota. Esta figura fue adaptada en el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) para establecer la estructura tridimensional Fosfolipasa A2 GIA del veneno de *Naja naja* basada en la información de la estructura cristalina de UniprotKB. (2021, 2 junio). Acidic phospholipase A2 2 - *Naja naja* (Indian cobra). Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/P15445>

Fosfolipasa A₂ GIA *Vipera ammodytes ammodytes*

10	20	30	40	50	
MRTLWIVAVC	LIGVEGSLLE	FGMMILGETG	KNPLTSYSFY	GCYCGVGGKG	
60	70	80	90	100	
TPKDATDRCC	FVHDCCYGNL	PDCSPKTDYR	KYHRENGAIV	CGKGTSCENR	
110	120	130			
ICECDRAAAI	CFRKNLKTYN	YIYRNYPDIL	CKEESEKC		

Fuente:

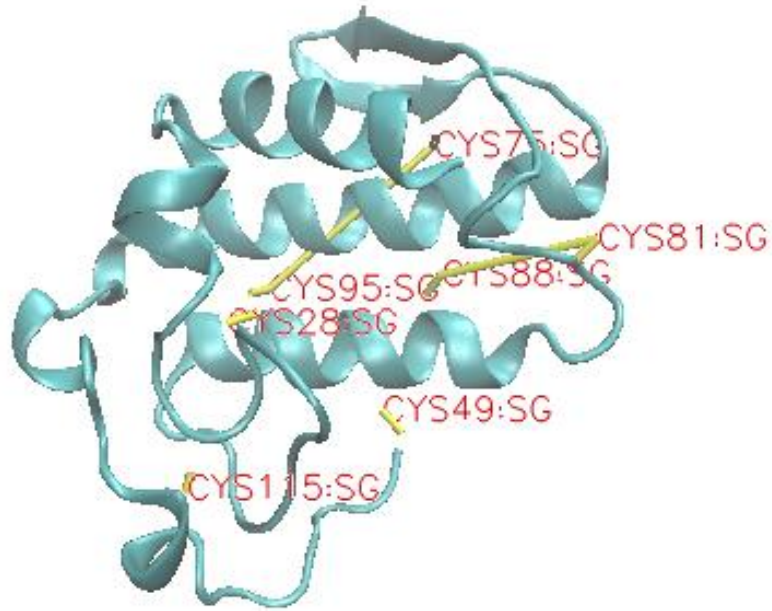


Figura 7. Fosfolipasa A2 GIIA del veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*.

Nota. Esta figura fue adaptada en el programa VMD para establecer la estructura tridimensional Fosfolipasa A2 GIIA del veneno de *Vipera ammodytes ammodytes* basada en la información de la estructura cristalina de UniprotKB. (2021, junio 2). Basic phospholipase A2 ammodytoxin C precursor - *Vipera ammodytes ammodytes* (Western sand viper). <https://www.uniprot.org/uniprot/P11407>.

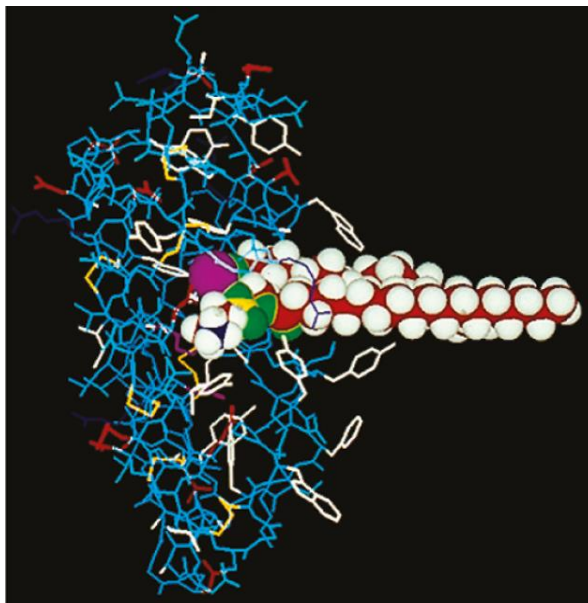


Figura 8. Actividad catalítica de enzimas sPLA₂.

Nota. Tomada de Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling por Burke, J., & Dennis, E., 1986. *Journal of Lipid Research*, 50, p. S238. (<https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>). Derechos reservados © 2009 ASBMB.

Grupo IA sPLA₂ con sustrato de fosfolípidos modelado en el sitio activo como un modelo de llenado de espacio. Los residuos del sitio activo His-48 y Asp-93 y el Ca²⁺ unido se muestran en violeta. El Ca²⁺ está unido por Asp-49 así como por los carbonil oxígenos de Tyr-28, Gly-30 y Gly-32. Los residuos aromáticos se muestran en blanco.

El estudio de la superfamilia PLA₂ tiene sus inicios en la identificación de acciones líticas del veneno de serpiente a finales del siglo XIX. La enzima se purificó y caracterizó primero del veneno de cobra y luego del veneno de serpiente de cascabel. En la década de 1970, se evidenció que estas enzimas tenían una cantidad inusualmente grande de cisteínas (>10% de los aminoácidos) y, como enzimas secretadas, todas estas cisteínas estaban formando enlaces disulfuro. Además, se reconoció que, las PLA₂ de cobras y serpientes de cascabel tenían seis disulfuros en común, pero un enlace disulfuro se encuentra en ubicaciones claramente diferentes. Esto llevó a la designación de Tipo 1 para cobras (serpientes del viejo mundo) y Tipo 2 para serpientes de cascabel (serpientes del nuevo mundo). Durante este período, los estudios sobre la enzima digestiva pancreática porcina que hidroliza fosfolípidos llevaron a determinar que esta enzima de mamífero (también la enzima pancreática humana) tenía el mismo patrón de enlace disulfuro que las cobras y, por lo tanto, se la designó como IB y a la enzima de cobra como IA.

En 1988, se informó sobre la purificación, secuenciación y clonación del primer PLA₂ secretado no pancreático humano, aislado del líquido sinovial humano de articulaciones artríticas de rodilla. La secuencia reveló que el patrón de enlace disulfuro se parecía más a la serpiente de cascabel que a la enzima pancreática humana, esta nueva forma de PLA₂ se denominó IIA y a la enzima de serpiente como IIB. Todas estas enzimas luego se conocieron como secretadas o sPLA₂, estas muestran una alta gama de distribución en tejidos de diferentes especies y cumplen distintas funciones fisiológicas. (Dennis et al., 2011).

Zambelli et al., 2017, en su revisión, menciona que los compuestos aislados de venenos de animales (serpientes, abejas y esponjas marinas) también podrían interferir con el dolor y la inflamación al inhibir la actividad de PLA₂ endógenas o exógenas, esta información se detalla en la *Tabla 4*. Dos compuestos que se aíslan de las esponjas de la familia *Luffariella* (manoalide y luffariellolide) y otro, de la esponja *Cacospongia mollior* (scalaradial), presentan efecto analgésico por sus propiedades antiinflamatorias. Estos tres compuestos tienen grupos aldehído latentes, CH = O (los lactoles, C-OH) o grupos aldehído reales, que reaccionan con uno o más residuos lisina de fosfolipasas A₂, formando enlaces Schiff-base (imina), pudiendo inhibir actividad fosfolipasa.

Tabla 4. Inhibidores de las fosfolipasas A₂ o PLA₂ derivadas de veneno animal con actividad antinociceptiva

Animal	Especies	Compuesto	Estructura	Mecanismo de analgesia
Serpiente	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Crotoxina	Fosfolipasa A ₂	Los receptores muscarínicos centrales, α-adrenoceptores, receptores de 5-HT y liberación de lipoxina A ₄
Serpiente	<i>Crotalus durissus terrificus</i> y <i>Naja naja atra</i>	VRCTC-310-Onco compuesto de crotoxina de <i>C. d. terrificus</i> y cardiotoxina de <i>N. n. atra</i> , en relación equimolar	Fosfolipasa A ₂ y un polipéptido de dieciséis aminoácidos	Aumento del nivel plasmático del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra)
Serpiente	<i>Vipera nikolskii</i>	HDP-2	Fosfolipasa A ₂	No confirmado

Abeja	<i>Apis mellifera</i>	bvPLA ₂	Fosfolipasa A ₂	Receptores α ₂ -adrenérgicos
Esponja marina	Familia <i>Luffariella</i> y <i>Cacospongia mollior</i>	Manoalide, luffariellolide y scalaradial	Estructura que contiene grupos aldehído	Inhibidor de fosfolipasa A ₂

Nota. Adaptado de Carvalho,2013. Snake venom PLA_{2s} inhibitors isolated from Brazilian plants: Synthetic and natural molecules. BioMed Research International, 2013. (<http://doi.org/10.1155/2013/153045>).

El descubrimiento de prototipos terapéuticos mediante análisis *in vitro* se muestra como una alternativa para la síntesis y bioensayos *in vivo* racionales de nuevas moléculas. En este sentido, se han estudiado compuestos que poseen actividades inhibitorias frente a fosfolipasas A₂ con estructuras moleculares de tipo flavonoide (Carvalho et al., 2013) similares a las cumarinas de este estudio, se muestran estructuras generales de estos dos tipos de moléculas en la *Figura 9*. Resaltamos que el anillo benzopirano es una estructura común e intermedia entre la síntesis de cumarinas y flavonoides, además que las cumarinas son estructuras ampliamente ligadas al tratamiento de enfermedades inflamatorias, por tanto el farmacóforo ligado a la acción antiinflamatoria es el anillo benzopirano, el mismo que ha presentado actividad anti sPLA₂ mediante inactivación del canal hidrofóbico de la enzima mencionada.

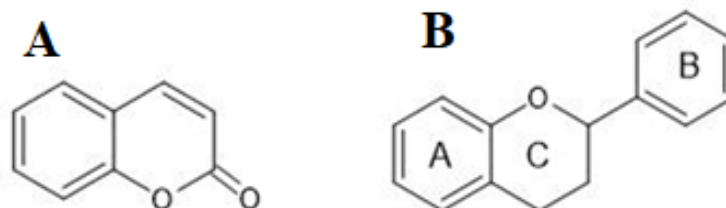


Figura 9.(A) Estructura general de las cumarinas, (B) Estructura general de los flavonoides.

El grupo de cumarinas seleccionado se debe en gran parte a su similitud estructural con los flavonoides que reportan actividad frente a sPLA₂ en los estudios de Carvalho et al., 2013; Chinnasamy et al., 2020; Melima-Hage et al., 2013; Novo Belchor et al., 2017; Pereañez et al., 2014; Ximenes et al., 2012, entre otros. Adicionalmente, existen datos de cumarinas inhibitoras de PLA₂ como en el estudio de Fonseca et al., 2010 en el cual se demostró que el 2-oxo-2H-cromen-3-carboxilato de etilo (EOCC), una cumarina sintética, inhibe irreversiblemente la fosfolipasa A₂ (sPLA₂) del veneno de *Crotalus durissus ruruima*, en el estudio de Toyama et al., 2009 se evidenció el efecto de la umbeliferona (7-hidroxycumarina, 7-HOC) que interactúa con sPLA₂ del veneno de *Crotalus durissus collilineatus* y causa algunas modificaciones estructurales que conducen a una fuerte disminución o inhibición de la actividad de esta enzima y en el estudio de Nargotra et al., 2011,

se realizaron estudios *in silico* que identificaron 27 estructuras cumarínicas como posibles inhibidores de la sPLA₂ de *Vipera russelli*.

Los fármacos actuales (AINEs) utilizados en el tratamiento del dolor y la analgesia presentan problemas relativos a un cierto grado de toxicidad y efectos secundarios indeseables. Así, es extremadamente importante incentivar investigaciones con foco al descubrimiento de moléculas con actividad inhibidora, potentes y específicas, sin efectos secundarios e indeseables, para disminuir la actividad enzimática de las PLA₂, a fin de mejorar el tratamiento de las enfermedades asociadas a esta enzima (Sales et al., 2017).

La importancia de este trabajo es contribuir con el conocimiento sobre estructuras químicas cumarínicas que pueden actuar como inhibidores de actividad fosfolipásica y que puedan ayudar en el desarrollo de prototipos que puedan llevar al descubrimiento de nuevos fármacos que podrían ser utilizados en la clínica médica para el tratamiento del dolor y la analgesia.

Este trabajo, realizó estudios "*in vitro*" con 10 cumarinas sintéticas para evaluar su capacidad inhibitoria frente a la actividad enzimática de las sPLA₂ presentes en venenos totales de serpientes de las familias *Elapidae* y *Viperidae*, así, se han identificado estructuras químicamente activas del conjunto de cumarinas estudiadas y en base al análisis químico estructural de estas moléculas con actividad anti sPLA₂ se pretende plantear sugerencias para la síntesis de nuevas moléculas con mayor actividad en estudios a futuro.

El trabajo de titulación aporta al perfil de egreso presentando el descubrimiento de nuevos principios activos y la evaluación de nuevas moléculas cumarínicas que podrían ser potenciales fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las sPLA₂.

El objetivo de este trabajo fue, evaluar "*in vitro*", la actividad de un conjunto de cumarinas candidatas a potenciales inhibidores de fosfolipasas A₂ (PLA₂) de venenos totales de serpientes y, a partir de estas evaluaciones analizar la estructura química de las cumarinas para entender su actividad enzimática anti PLA₂.

Como hipótesis del trabajo planteamos que, "El estudio *in vitro* de las actividades enzimáticas anti sPLA₂ de las moléculas de tipo flavonoide como las cumarinas puede permitir encontrar nuevos inhibidores más selectivos y eficaces de la sPLA₂".

2. Materiales y métodos

2.1 Búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad enzimática anti PLA₂

Con el fin de explorar las características estructurales de moléculas inhibitorias de enzimas sPLA₂, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica. En esta revisión se incluyeron compuestos que reportaron actividad inhibitoria “*in silico*” e “*in vitro*”, explorando las principales bases digitales tales como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Google Scholar, y PubMed. Se incluyeron artículos comprendidos desde el año 2011 al 2021.

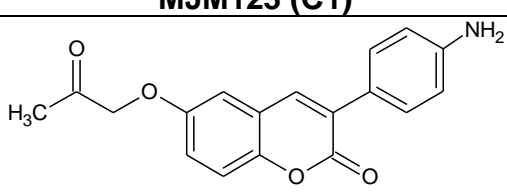
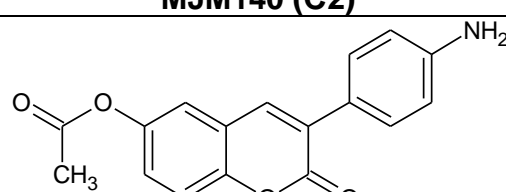
2.2 Evaluación “*in vitro*” de la actividad anti PLA₂

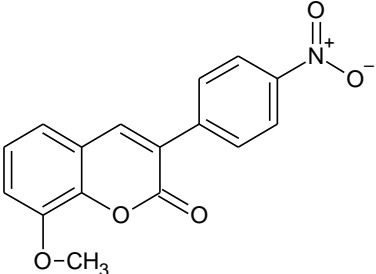
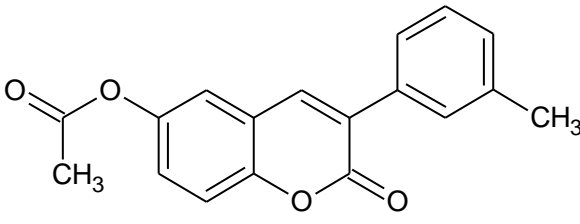
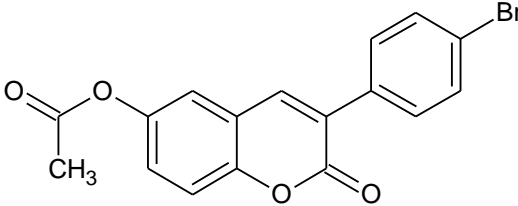
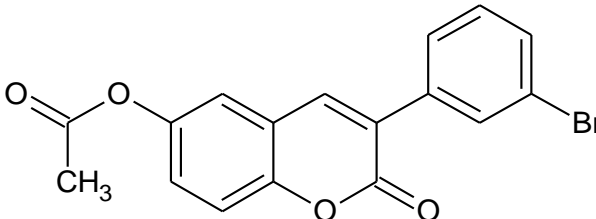
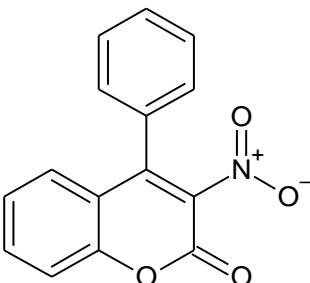
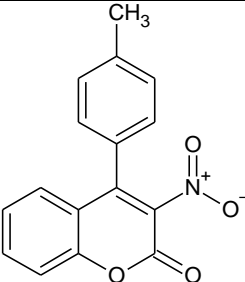
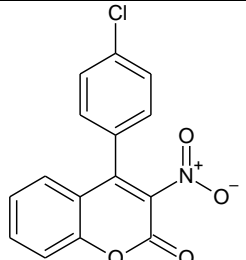
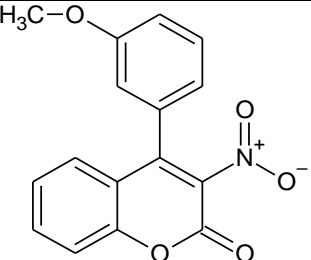
2.2.1 Procedencia de los compuestos sintéticos evaluados como inhibidores de PLA₂

Los compuestos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por un grupo de científicos de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). El grupo de compuestos está constituido por 10 moléculas sintéticas de tipo cumarinas.

El laboratorio de Química Farmacéutica de la USC trabaja en el desarrollo de pequeñas moléculas con potencial actividad biológica frente a diferentes dianas terapéuticas, cabe indicar que las moléculas de este estudio no han sido evaluadas previamente frente a enzimas fosfolipasas (Matos et al., 2012, 2013; Pisano et al., 2019; Vázquez et al., 2015). En base a resultados de actividad biológica evaluados “*in vitro*” ante diferentes blancos terapéuticos, se seleccionó una familia de cumarinas con diversos sustituyentes, con el fin de probar su potencial como inhibidores de la fosfolipasa A₂ en venenos totales de serpientes. Se incluyeron 10 nuevos compuestos (*Tabla 5*), que se seleccionaron teniendo en cuenta datos previos y que la variabilidad de rasgos estructurales nos permitiese la conclusión de relaciones estructura/actividad.

Tabla 5. Moléculas de cumarinas probadas en el estudio

MJM123 (C1)	MJM140 (C2)
	
MJM167 (C3)	MJM129 (C4)

	
MJM131 (C5)	MJM139 (C6)
	
MJM172 (C7)	MJM175 (C8)
	
MJM177 (C9)	MJM178 (C10)
	

2.2.2 Procedimientos generales para la síntesis de cumarinas

Las cumarinas pueden provenir de la naturaleza o ser sintetizadas mediante distintas reacciones químicas, introduciendo diferentes sustituyentes en el esqueleto de la molécula para dirigir estas estructuras químicas a diferentes dianas farmacológicas. Las rutas sintéticas más utilizadas para la obtención del esqueleto químico de la cumarina incluyen las reacciones de Perkin, Reformatsky, Knoevenagel, Wittig, Pechman y Kostanechi-Robinson (*Figura 10*) (Borges et al. 2005; Matos, 2010, Vázquez et al., 2015).

Merck® suministró todos los productos químicos utilizados en la síntesis de cumarinas. Los compuestos sintetizados fueron purificados mediante cromatografía

de columna se realizó sobre gel de sílice (Merck 60, malla 230-400) y caracterizados por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) monodimensional de ^1H y ^{13}C , y Espectrometría de Masas (MS). Los espectros RMN fueron registrados con un espectrómetro Bruker AMX, y la espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro Kratos MS-50 o un Varian MAT-711. Los espectros RMN y MS se encuentran disponibles en el laboratorio de Química Farmacéutica de la USC. Los puntos de fusión (P.F.) se determinaron utilizando un termopar Reichert Kofler o en tubos capilares en un aparato Büchi 510, y no están corregidos. Los análisis elementales se realizaron con un microanalizador Perkin-Elmer 240B y estuvieron dentro de $\pm 0.4\%$ de los valores calculados en todos los casos.

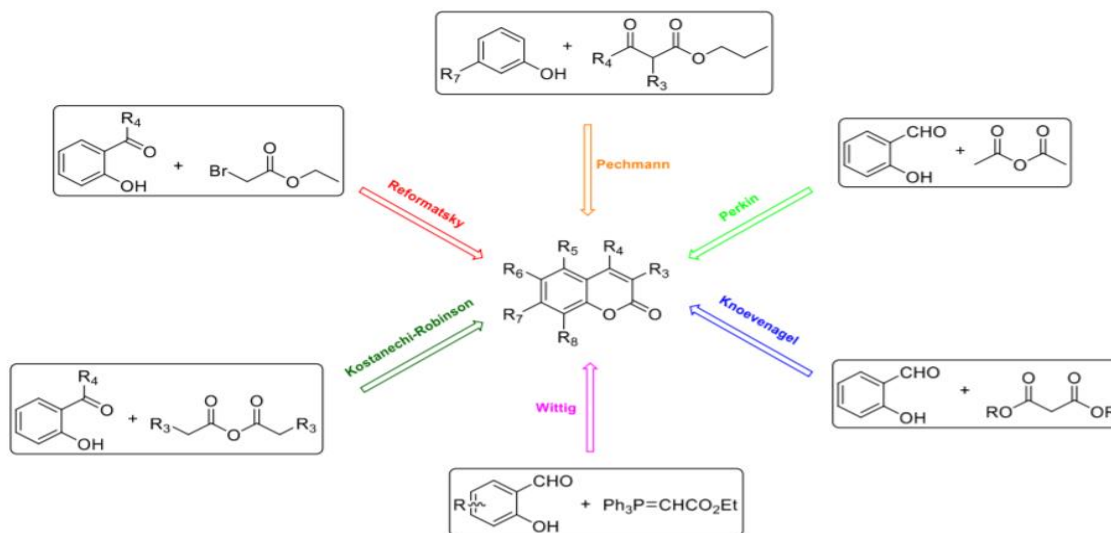


Figura 10. Rutas para la síntesis de cumarinas

Nota. Tomado de López Cisneros, C. (2020). Estudio y alternativas de tratamiento de dermatofitosis frecuentes en Cuenca, Ecuador. Universidad Santiago de Compostela. [<https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/24114>]

2.2.3 Evaluación de la actividad de PLA₂ (ensayos in vitro)

Las mediciones de la actividad enzimática utilizando el sustrato NOBA se realizaron según el método descrito por Holzer & Mackessy, 1996 y adaptado para una microplaca de 96 pocillos. El ensayo estándar contenía 200 μL de tampón (Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), 20 μL de sustrato (NOBA) a una concentración de 0,25 mM (disuelto en 3 mM de acetonitrilo), 20 μL de veneno total (1,0 mg / mL) y 20 μL de cumarinas inhibidoras disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones de 1, 2 y 4 μM . El control negativo recibió solo DMSO. El efecto inhibitor de cumarinas sobre PLA₂ se determinó mediante la co-incubación de la enzima con cada inhibidor durante 30 minutos a 37 ° C y justo antes de analizar la actividad de PLA₂ residual de la enzima. Después del período de

incubación, se añadió al ensayo la solución que contenía PLA₂ (o inhibidor de PLA₂) y se controló la reacción a 425 nm durante 20 min (intervalos de 2 min) a 37°C. La cantidad de cromóforo liberado (ácido 4-nitro-3-hidroxibenzoico) fue proporcional a la actividad enzimática y la velocidad inicial (V_0) se calculó considerando la absorbancia medida en 20 minutos. Se realizaron tres experimentos independientes y en cada experimento las mediciones se realizaron en seis réplicas, utilizando un espectrofotómetro de microplacas EPOCH™ de BioTek de procedencia Alemana. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de inhibición de la actividad de la fosfolipasa.

2.3 Evaluación de las características estructurales de las cumarinas activas anti sPLA₂

La familia de cumarinas evaluada por su potencial inhibitorio ante la enzima sPLA₂ fue sometida a un análisis con el objetivo de identificar características estructurales relacionadas con la bioactividad observada. Para el efecto se compararon los patrones de sustitución, tipos y características electrónicas de los sustituyentes, con los compuestos reportados como inhibidores de la enzima sPLA₂, encontrados en la revisión bibliográfica. A partir de esta revisión se identificaron rasgos estructurales característicos de moléculas bioactivas ante sPLA₂, con el fin de guiar nuevos procesos de síntesis de moléculas promisorias ante este blanco farmacológico.

3. Resultados y Discusión:

3.1 Búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad enzimática inhibitoria de sPLA₂

Los resultados de la revisión bibliográfica de moléculas inhibitorias de la enzima sPLA₂ incluyen compuestos naturales y sintéticos.

Se revisaron un total de 26 estudios acerca de la inhibición de sPLA₂. Los estudios revisados, engloban ensayos de compuestos naturales y sintéticos que muestran la actividad inhibitoria frente a sPLA₂ de novedosas moléculas cuyas estructuras se evidencian en el *Anexo 1* de este trabajo. Sin considerar moléculas repetidas, se recopilaron 93 estructuras químicas que poseen actividad inhibitoria frente a sPLA₂, de éstas existen estructuras similares a las moléculas sintéticas involucradas en este estudio. Revisamos las estructuras y las clasificamos en dos grandes grupos, moléculas de origen natural y de origen sintético. En el grupo de las moléculas de origen natural tenemos compuestos fenólicos, terpenoides, heterocíclicos, fitosteroles, amidas, glucósidos, organosulfurados, ésteres de ácido graso y bencenoides y en el grupo de las moléculas de origen sintético tenemos compuestos fenólicos, terpenoides, heterocíclicos, amidas, ésteres y bencenoides.

3.2 Evaluación de la actividad sPLA₂:

En la *Tabla 6* se muestran los resultados de la actividad anti sPLA₂ de las cumarinas probadas, de la cuales ninguna inhibió la actividad sPLA₂ (PLA₂ GI) de los elápidos V8 - V10. Las cumarinas C1 - C4 inhiben la actividad PLA₂ (PLA₂ GII) de vipéridos y crotalinos (V1-V7) sin distinción; no hubo una preferencia o inhibición más significativa por los venenos de los dos tipos de subfamilias de serpientes. Como referencia, fueron tomadas las inhibiciones producidas por las cumarinas en concentraciones de 4 µM. Las mejores inhibiciones de las actividades PLA₂ de vipéridos y crotalinos se obtuvieron mediante las cumarinas C1, C2, C3 (inhiben entre 80 y 40%), la cumarina C4, inhibe poco la actividad PLA₂ de vipéridos y crotalinos (inhibe aproximadamente un 20%). Las cumarinas C5, C6, C7, C8, C9 y C10 no inhiben las actividades de PLA₂ (inhibición inferior al 5%).

Las siguientes actividades tomaron como referencia la concentración más alta en todas las pruebas: 4 µM

Tabla 6. Resultados de actividad anti sPLA₂

Venenos	Especies	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
1	<i>Bothrops moojeni</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Bothrops jararacussu</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Bothrops bilineatus bilineatus</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Bothrops brazili</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Crotalus atrox</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Crotalus viridis viridis</i>	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Micrurus surinamensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Micrurus frontalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Micrurus spixxi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota. Los signos presentes en la *Tabla 5* tienen el siguiente significado: **+**: Activo (inhibición entre 80% y 40%). **+/-**: Poco Activo (inhibición entre 40% y 20%). **-**: Inactivo (inhibición menos del 5%)

A continuación, se analizaron las actividades exhibidas por las moléculas de este estudio frente a sPLA₂, así como las características estructurales de las enzimas de

esta familia, presentes en los venenos de serpientes incluidos en esta investigación. La actividad de las cumarinas C1 – C10 frente a sPLA₂ de los venenos V1 – V7 la discutiremos en la sección de evaluación de las características estructurales de las cumarinas. En esta sección discutiremos la razón de la inactividad de las cumarinas C1 – C10 frente a sPLA₂ de los venenos V8 – V10 y es que, podemos mencionar que las sPLA₂ del Grupo IA (GI) presentes en las serpientes de la familia *Elapidae* (*Micrurus*) y las sPLA₂ del Grupo II (IIA/IIB) de la familia *Viperidae* (en donde *Crotalidae* es una subfamilia) poseen similitud de secuencia, posición de enlaces disulfuro e inserciones de bucles (Schaloske & Dennis, 2006). Las sPLA₂ de serpiente de los grupos IA y IIA poseen siete enlaces disulfuro en donde, seis de ellos se conservan en las familias *Elapidae* y *Viperidae*, mientras que los enlaces disulfuro Cis11/Cis77 y Cis51/Cis133, es decir el séptimo enlace, solo se encuentran en elápidos y vipéridos, respectivamente (Dennis et al., 2011; Schaloske & Dennis, 2006).

Las sPLA₂ del GI y GII tienen un sitio catalítico formado por His/Asp y un bucle de unión de Ca²⁺ altamente conservado para la actividad catalítica. Aunque el nivel de identidad de aminoácidos es bajo, todas estas enzimas comparten un pliegue de proteína común (*Figura 11*) con ligeras diferencias y presentan la misma díada catalítica His/Asp. Las sPLA₂ GI, IIA y X tienen estructuras muy similares que contienen tres hélices α largas, láminas β de dos hebras denominadas alas β y un bucle de unión de Ca²⁺ conservado (Dennis et al., 2011; Guy et al., 2009). Entendiendo la similitud de sPLA₂ del grupo I y II podemos decir que el séptimo enlace disulfuro (Cis11/Cis77) presente en la familia de los elápidos (*Micrurus*) es probablemente el responsable de que las cumarinas no puedan ejercer su actividad frente a la enzima, es decir, este enlace disulfuro entre los dos grupos cambia y por tanto altera la actividad anti sPLA₂ de las cumarinas C8 – C10, recomendamos a futuro estudios de relación estructura actividad para entender cómo afecta la disposición de este enlace a la actividad de las cumarinas propuestas.



Figura 11. Estructura general del grupo IA sPLA₂

Nota. Estructura general del grupo IA sPLA₂. Las hélices están en magenta, las hebras β están en verde, el calcio se muestra como una esfera roja y los enlaces disulfuro se muestran como barras amarillas. Dennis, 2011. Adaptado de Phospholipase A2 Enzymes:

Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention por Dennis et al., 2011, Chemical Reviews, 111(10), p. 6135. (doi.org/10.1021/cr200085w) Derechos de autor © 2011 American Chemical Society

A continuación, presentamos los gráficos de las inhibiciones de la actividad (derecha) y el gráfico del porcentaje de inhibición (izquierda).

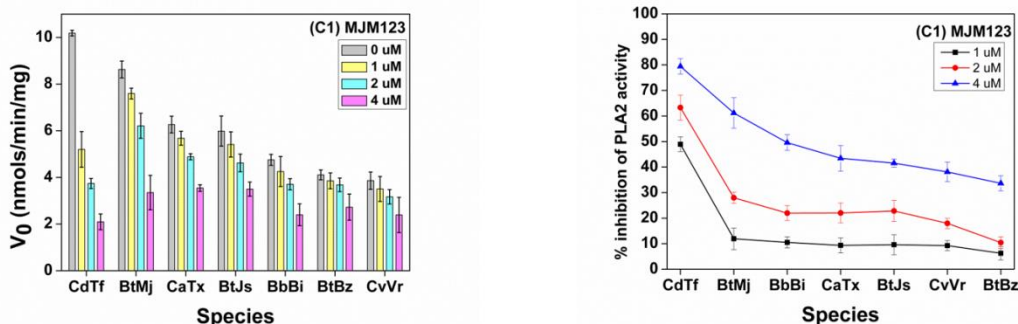


Figura 12. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 1.

Leyenda. CdTf: *Crotalus durissus terrificus*, BtMj: *Bothrops moojeni*, BbBi: *Bothrops bilineatus bilineatus*, CaTx: *Crotalus atrox*, BtJs: *Bothrops jararacussu*, CvVr: *Crotalus viridis viridis*, BtBz: *Bothrops brazili*.

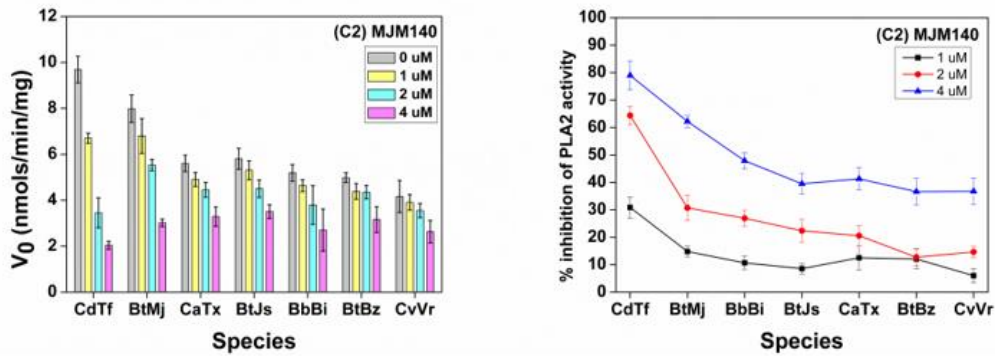


Figura 13. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 2.

Leyenda. CdTf: *Crotalus durissus terrificus*, BtMj: *Bothrops moojeni*, BbBi: *Bothrops bilineatus bilineatus*, CaTx: *Crotalus atrox*, BtJs: *Bothrops jararacussu*, CvVr: *Crotalus viridis viridis*, BtBz: *Bothrops brazili*.

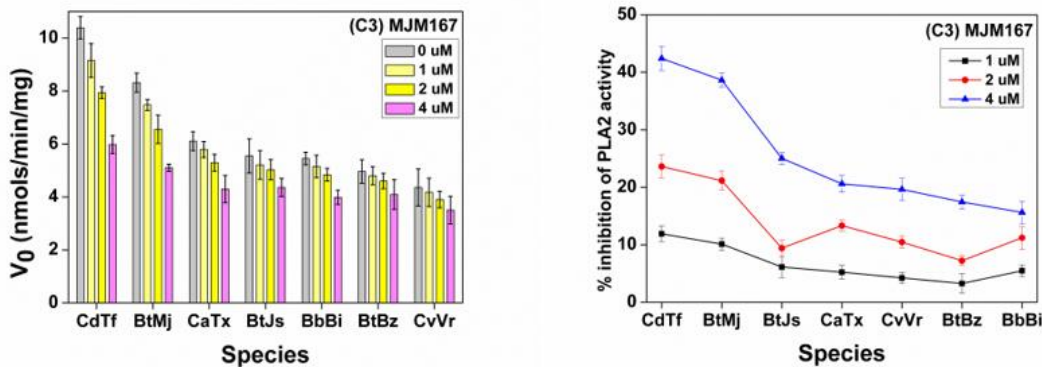


Figura 14. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 3.

Leyenda. CdTf: *Crotalus durissus terrificus*, BtMj: *Bothrops moojeni*, BbBi: *Bothrops bilineatus bilineatus*, CaTx: *Crotalus atrox*, BtJs: *Bothrops jararacussu*, CvVr: *Crotalus viridis viridis*, BtBz: *Bothrops brazili*.

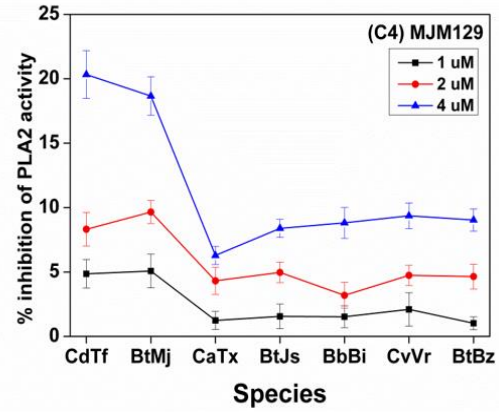
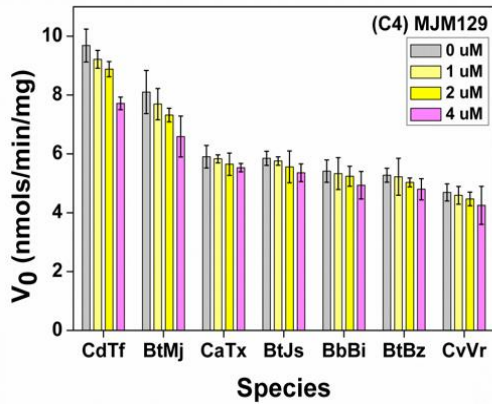


Figura 15. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 4.

Nota: CdTf: *Crotalus durissus terrificus*, BtMj: *Bothrops moojeni*, BbBi: *Bothrops bilineatus bilineatus*, CaTx: *Crotalus atrox*, BtJs: *Bothrops jararacussu*, CvVr: *Crotalus viridis viridis*, BtBz: *Bothrops brazili*.

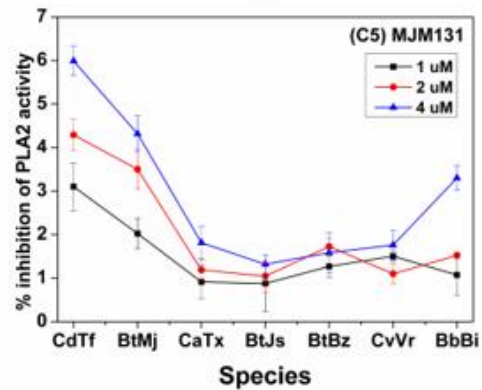
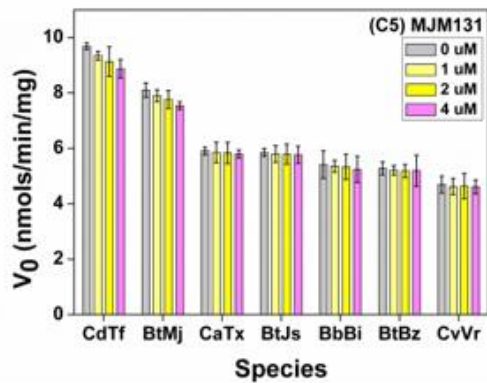


Figura 16. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 5.

Leyenda. CdTf: *Crotalus durissus terrificus*, BtMj: *Bothrops moojeni*, BbBi: *Bothrops bilineatus bilineatus*, CaTx: *Crotalus atrox*, BtJs: *Bothrops jararacussu*, CvVr: *Crotalus viridis viridis*, BtBz: *Bothrops brazili*.

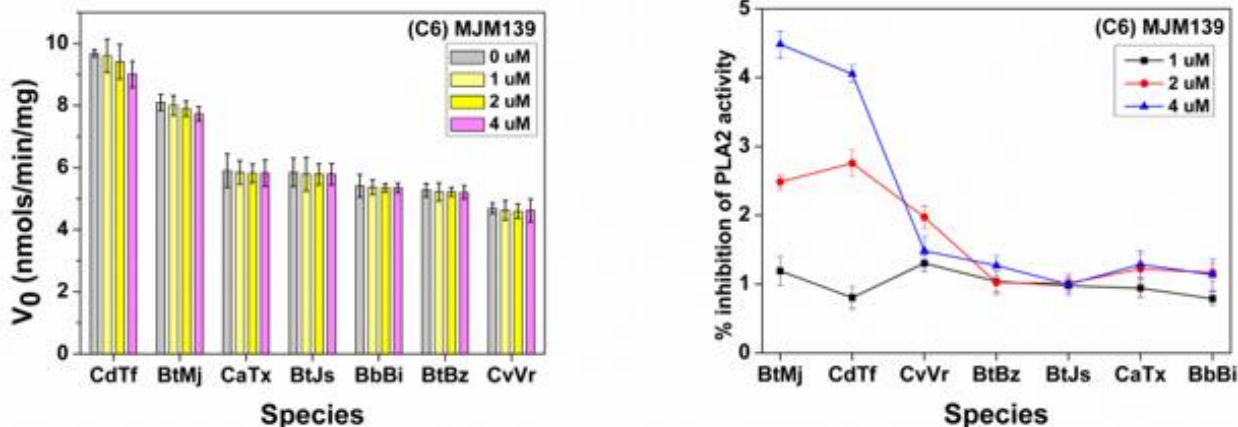


Figura 17. Velocidad inicial de reacción de la actividad anti sPLA₂ y porcentaje de inhibición de actividad anti sPLA₂ de los venenos totales de serpientes frente a la cumarina 6.

Leyenda. CdTf: *Crotalus durissus terrificus*, BtMj: *Bothrops moojeni*, BbBi: *Bothrops bilineatus bilineatus*, CaTx: *Crotalus atrox*, BtJs: *Bothrops jararacussu*, CvVr: *Crotalus viridis viridis*, BtBz: *Bothrops brazili*.

Las cumarinas C1, C2, C3 tuvieron mejor efecto inhibitorio frente a las sPLA₂ de vipéridos y crotalinos, obteniéndose un porcentaje de inhibición entre 80 y 40% con la máxima concentración de cada cumarina (4μM) que se pueden observar en las Figuras 12, 13 y 14. La cumarina C4, tiene una baja inhibición de la actividad sPLA₂ de vipéridos y crotalinos, aproximadamente un 20% a una concentración de 4μM de la cumarina que se observa en la Figura 13. Las cumarinas C5, C6, C7, C8, C9 y C10 no inhiben o tienen una inhibición menor a 5% a una concentración de 4μM de las cumarinas respectivas, las Figuras 16 y 17 representan la actividad de las cumarinas 5 y 6, no se presentan gráficas de actividad de las de más cumarinas puesto que su actividad es nula o irrelevante.

3.3 Evaluación de características estructurales de las cumarinas sintéticas con actividad anti sPLA₂ del estudio

La información recopilada a partir de la revisión de literatura, que se muestra en el Anexo 2, muestra una gran diversidad estructural de moléculas naturales y sintéticas, promisorias por su capacidad inhibitoria de la enzima sPLA₂. Las 93 moléculas reportadas se agrupan mayoritariamente en compuestos fenólicos, terpenoides y heterociclos naturales y sintéticos. Dentro del grupo de productos naturales se reportan numerosos compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen flavonoides (Carvalho et al., 2013; Chinnasamy et al., 2020; Melima-Hage et al., 2013; Novo Belchor et al., 2017; Pereañez et al., 2014; Ximenes et al., 2012).

En el presente trabajo se evaluaron en un ensayo “*in vitro*” 10 estructuras de tipo cumarinas. Las moléculas C1, C2, C3 y C4 presentan actividad inhibitoria frente a los venenos de vipéridos y crotalinos. Estos compuestos poseen una alta similaridad estructural con los flavonoides, lo cual nos lleva a relacionar esta particularidad con

el estudio de (Carvalho et al., 2013), mismo que menciona que, los flavonoides ejercen su efecto inhibitor a través de interacciones hidrofóbicas con los anillos A y B y residuos de aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos en la proteína.

Novo Belchor et al., 2017, en su estudio evaluó la Quercetina (Q) y sus derivados metilados ramentina (Rhm), ramnazina (Rhaz) y 3-O-metilquercetina (3MQ) con el objetivo de buscar nuevos compuestos capaces de inhibir la acción de la enzima PLA₂. En este ensayo se utilizó sPLA₂ de *Bothrops jararacussu* y se evidenció que, entre las quercetinas metiladas, Rhaz exhibió mayor inhibición que 3MQ y Rhm (Figura 18). La actividad inhibitoria de Rhaz fue similar a Q. A pesar de que Rhaz mostró metilación en el anillo A y el anillo B, la presencia de 3-OH en el anillo C fue probablemente un grupo común en los flavonoles Rhm, Rhaz y Q, lo que lleva a la inhibición de sPLA₂. Sin embargo, Rhaz exhibe una mayor inhibición que Rhm debido a la presencia del grupo metilado en el anillo B. Se observó una mayor interacción con sPLA₂ en Q, exhibiendo mayor inhibición entre las quercetinas estudiadas. Además, el análisis de los resultados de este estudio mostró que el reemplazo del grupo OH en el anillo C por un grupo metilo abolió casi por completo la capacidad inhibitoria de 3MQ frente a sPLA₂.

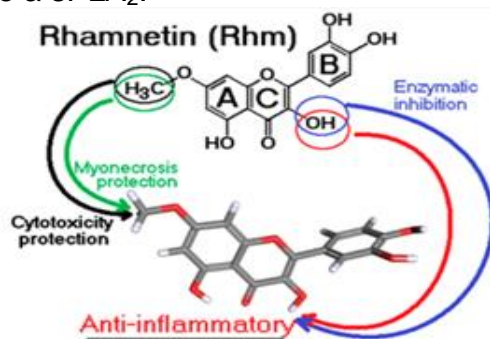


Figura 18. Relación estructura-función entre regiones moleculares de Rhm y sus actividades.

Nota. Tomada de Evaluation of Rhamnetin as an Inhibitor of the Pharmacological Effect of Secretory Phospholipase A₂ por Novo Belchor et al., 2017, *Molecules*, 22(9), p. 5. (doi.org/10.3390/molecules22091441) Derechos de autores © 2017.

El análisis estructural de los compuestos incluidos en este estudio muestra que las cumarinas C1 a C4, con actividad anti sPLA₂ no tienen un grupo metilo como sustituyente en el anillo C. Así mismo, las moléculas tipo flavonoide, reportadas en nuestra revisión de literatura no exhiben metilación en el anillo C (Carvalho et al., 2013; Chinnasamy et al., 2020; Melima-Hage et al., 2013; Novo Belchor et al., 2017; Pereañez et al., 2014; Ximenes et al., 2012). Este rasgo estructural sería relevante en la actividad inhibitoria de la enzima sPLA₂.

El mecanismo inhibitorio de las cumarinas implica el ataque nucleofílico de los residuos de aminoácidos y la unión al gran bolsillo hidrofóbico de la sPLA₂. La pérdida de la integridad de la bolsa hidrofóbica induce una pérdida irreversible de la

actividad enzimática. En consecuencia, todos los efectos biológicos que dependen de la actividad catalítica de sPLA₂ quedan virtualmente abolidos. Dado que la estabilidad de la hélice alfa en la cavidad hidrofóbica debería verse afectada por la estabilidad de otras estructuras, como el bucle de unión al calcio o el ala beta, es posible que los efectos farmacológicos inducidos por la interacción de sPLA₂ con el receptor se vean afectados. Esta hipótesis está fuertemente respaldada por estudios de sPLA₂ modificados con otros compuestos polifenólicos (Iglesias et al., 2005; Toyama et al., 2009), así como por otros estudios (Harper and Powers, 1985; Liu et al., 2008). Podemos decir que los efectos farmacológicos de compuestos polifenólicos derivados de plantas relacionados, como cumarinas, flavonoides, terpenoides y alcaloides tienen capacidad inhibitoria frente a sPLA₂.

Además, podemos notar que entre las primeras cuatro cumarinas hay un patrón de sustitución común que se muestra en la *Figura 19* y los sustituyentes en la *Tabla 7*. Las cumarinas C1 – C3 tienen una actividad entre el 40% y 80%. Esta actividad puede ser influenciada por los sustituyentes amino y nitro presentes en la posición *para* (R2) el anillo B. Los sustituyentes nitrogenados ejercen un efecto **no inductivo** en el anillo bencénico, el cual estaría relacionado a la habilidad de las moléculas para acceder al sitio activo de la molécula cediendo cargas. La cumarina C4 posee una actividad inhibitoria entre el 20% y 40%, con un patrón de sustitución en el anillo B diferente de los compuestos C1 – C3. La ausencia del grupo nitrogenado en la posición *para* (R2) puede influir en la disminución de la actividad inhibitoria frente a sPLA₂.

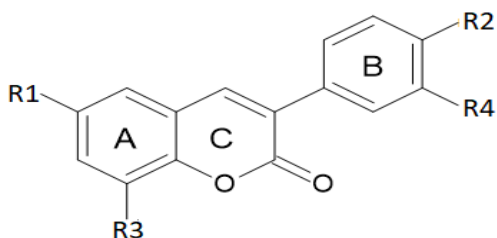


Figura 19. Estructura básica cumarina C1–C4 con actividad anti sPLA₂ del estudio

Tabla 7. Sustituyentes cumarinas C1–C4 con actividad anti sPLA₂ del estudio.

	C1	C2	C3	C4
R1	OCH ₂ COCH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₃
R2	NH ₂	NH ₂	NO ₂	H
R3	H	H	OCH ₃	H
R4	H	H	H	CH ₃

Las cumarinas C5 y C6 no exhibieron actividad anti sPLA₂. La presencia de un sustituyente halógeno en la posición R2 (C5) y R4 (C6) que se muestra en la *Figura 20* junto con sus sustituyentes en la *Tabla 8*, ejercería un efecto inductivo fuerte en el anillo B. Comparando esta característica estructural con las moléculas bioactivas reportadas en nuestra revisión bibliográfica encontramos que no se reportan compuestos con sustituyentes halógenos en el anillo B (Carvalho et al., 2013; Chinnasamy et al., 2020; Melima-Hage et al., 2013; Novo Belchor et al., 2017; Pereañez et al., 2014; Ximenes et al., 2012). Estos hallazgos indican que el efecto inductivo ejercido por el sustituyente, debido a su elevada electronegatividad, genera un impedimento al anillo B y causa la pérdida de actividad anti sPLA₂.

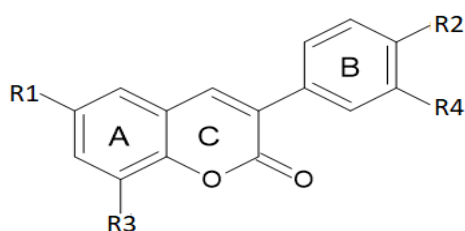


Figura 20. Estructura básica cumarina C5 – C6

Tabla 8. Sustituyentes cumarinas C5 – C6

	C5	C6
R1	OCOCH ₃	OCOCH ₃
R2	<u>Br</u>	H
R3	H	H
R4	H	<u>Br</u>

Las cumarinas C7 a C10 no exhiben actividad anti sPLA₂. En estos compuestos, la posición del anillo B cambia del C₃ al C₄ en el anillo C como se compara en la *Figura 21* y la *Figura 22*. Además, la posición *meta* en el anillo C se encuentra nitrada. El cambio de posición del anillo B genera un impedimento estérico, inactivando las moléculas ante la enzima sPLA₂. Este impedimento estérico cambia la estructura tridimensional de la molécula, lo cual puede afectar en la unión de esta al sitio activo de la enzima.

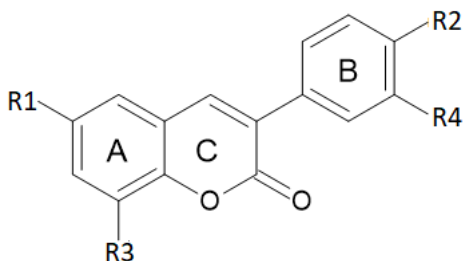


Figura 21. Estructura básica cumarinas C1 – C6

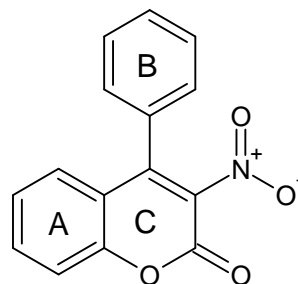


Figura 22. Estructura básica cumarinas C7 – C10

4. Conclusiones:

En la búsqueda bibliográfica se encontraron compuestos fenólicos dentro de los cuales figuran los flavonoles, muy similares en cuanto a estructura con las cumarinas de este estudio. Existen compuestos de origen natural y sintético que interactúan con el sitio catalítico de la enzima sPLA₂ conformado por His/Asp, hacemos mención que nuestra búsqueda bibliográfica se encaminó a la búsqueda de compuestos que interactúen con estas enzimas en específico, ya que las demás PLA₂ tienen sitios catalíticos diferentes y por tanto el mecanismo de acción podría ser diferente, por tanto, los compuestos reportados en la búsqueda bibliográfica así como los sintéticos de este estudio han demostrado su afinidad por las sPLA₂.

La evaluación *“in vitro”* reportó la actividad anti sPLA₂ de cuatro cumarinas, estas guardaban estrecha relación con la estructura de los flavonoides, lo cual se evidencia en la pérdida de actividad cuando el anillo C cambia de lugar como sustituyente en el anillo B, esto nos lleva a concretar búsquedas futuras más

específicas con moléculas que tengan la estructura de las primeras cuatro cumarinas con la finalidad de obtener resultados más promisorios en cuanto a inhibidores de sPLA₂.

El análisis químico estructural de las cumarinas de este estudio nos permite determinar que nuevos compuestos con actividad anti sPLA₂ deben tener patrones de sustitución similares a las cumarinas C1 – C4 e incluso en el análisis mencionamos que, compuestos con sustituyentes nitrogenados nos reportaban mayor actividad como el caso de las cumarinas C1 – C3, ya que ejercen un efecto no inductivo, es decir ceden sus cargas y pueden unirse con mayor facilidad al sitio activo de la enzima. No obstante, se recomiendan estudios a futuro con este tipo de cumarinas y sustituyentes nitrogenados mediante estudios de relación estructura actividad a fin de encontrar compuestos mucho más eficaces y modelos químicos que permitan la síntesis de nuevos compuestos para la inhibición de estas enzimas.

5. Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco de un programa conjunto de posgrados VLIR NETWORK.

Agradecemos al grupo de Síntesis Orgánica de la Universidad Santiago de Compostela, al Grupo de Investigaciones de Brasil coordinado por el Dr. Andreimar Martins Soares y al Grupo de Investigaciones de Portugal coordinado por los Drs. Maria Joao Ramos y Pedro Fernandes.

6. Referencias

- Alam, M. I., Alam, M. A., Alam, O., Nargotra, A., Taneja, S. C., & Koul, S. (2016). Molecular modeling and snake venom phospholipase A2 inhibition by phenolic compounds: Structure–activity relationship. *European journal of medicinal chemistry*, 114, 209-219.
- Alasmary, F. A., Alnahdi, F. S., Ben Bacha, A., El-Araby, A. M., Moubayed, N., Alafeefy, A. M., & El-Araby, M. E. (2017). New quinoxalinone inhibitors targeting secreted phospholipase A2 and α -glucosidase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 1143-1151.
- Anilkumar, N. C., Sundaram, M. S., Mohan, C. D., Rangappa, S., Bulusu, K. C., Fuchs, J. E., Girish, K. S., Bender, A., & Rangappa, K. S. (2015). A one pot synthesis of novel

bioactive tri-substitute-condensed-imidazopyridines that targets snake venom phospholipase a2. *PloS one*, 10(7), e0131896.

Batsika, C. S., Gerogiannopoulou, A.-D. D., Mantzourani, C., Vasilakaki, S., & Kokotos, G. (2021). The design and discovery of phospholipase A2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Drug Discovery*, just-accepted.

Bukhari, S. N. A., Lauro, G., Jantan, I., Bifulco, G., & Amjad, M. W. (2014). Pharmacological evaluation and docking studies of α , β -unsaturated carbonyl based synthetic compounds as inhibitors of secretory phospholipase A2, cyclooxygenases, lipoxygenase and proinflammatory cytokines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(15), 4151-4161.

Calvete, J. J. (2013). Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, 75, 44-62.

Carvalho, B., Santos, J., Xavier, B., Almeida, J., Resende, L., Martins, W., Marcussi, S., Marangoni, S., Stábeli, R., & Calderon, L. (2013). Snake venom PLA2s inhibitors isolated from Brazilian plants: Synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013.

Castañeda, I. H., Pereañez, J., & Jios, J. (2012). Substituted thiobenzoic acid S-benzyl esters as potential inhibitors of a snake venom phospholipase A2: Synthesis, spectroscopic and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 1028, 7-12.

Chinnasamy, S., Selvaraj, G., Selvaraj, C., Kaushik, A. C., Kalamurthi, S., Khan, A., Singh, S. K., & Wei, D.-Q. (2020). Combining in silico and in vitro approaches to identification of potent inhibitor against phospholipase A2 (PLA2). *International journal of biological macromolecules*, 144, 53-66.

- Da Silva, S., Calgarotto, A., Maso, V., Damico, D., Baldasso, P., Veber, C., Villar, J., Oliveira, A., Comar Jr, M., & Oliveira, K. (2009). Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(1), 312-321.
- De Alvarenga, E., Silva, S., Barosa, L., Demuner, A., Parreira, A., Ribeiro, R., Marcussi, S., Ferreira, J., Resende, R., & Granjeiro, P. (2011). Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*, *57*(1), 100-108.
- De Angelis, F., & Maria Tata, A. (2016). Analgesic effects mediated by muscarinic receptors: Mechanisms and pharmacological approaches. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, *16*(3), 218-226.
- Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., & Kokotos, G. (2011). Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical reviews*, *111*(10), 6130-6185.
- El-Sayed, N. N., Almaneai, N. M., Ben Bacha, A., Al-Obeed, O., Ahmad, R., Abdulla, M., & Alafeefy, A. M. (2019). Synthesis and evaluation of anticancer, antiphospholipases, antiproteases, and antimetabolic syndrome activities of some 3 H-quinazolin-4-one derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *34*(1), 672-683.
- Filkin, S. Y., Lipkin, A., & Fedorov, A. (2020). Phospholipase superfamily: Structure, functions, and biotechnological applications. *Biochemistry (Moscow)*, *85*(1), 177-195.
- Fonseca, F., Baldissera Jr, L., Camargo, E., Antunes, E., Diz-Filho, E., Corrêa, A., Beriam, L., Toyama, D., Cotrim, C., & Toyama, M. (2010). Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate, on activity of *Crotalus durissus ruruima*

- sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor. *Toxicon*, 55(8), 1527-1530.
- Gopi, K., Renu, K., Vishwanath, B. S., & Jayaraman, G. (2015). Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality. *Journal of ethnopharmacology*, 165, 180-190.
- Guy, J. E., Ståhl, U., & Lindqvist, Y. (2009). Crystal structure of a class XIB phospholipase A2 (PLA2): Rice (*Oryza sativa*) isoform-2 pla2 and an octanoate complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19371-19379.
- Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193-200.
- Holzer, M., & Mackessy, S. P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, 34(10), 1149-1155.
- Hui, D. Y. (2012). Phospholipase A2 enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*, 23(3), 235.
- Kankara, I. A., Abdullahi, I., & Paulina, G. A. (2020). Ethnomedicinal plants: A source of phytochemical compounds against snake venom PLA2s activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 1270-1275.
- Kokotou, M. G., Limnios, D., Nikolaou, A., Psarra, A., & Kokotos, G. (2017). Inhibitors of phospholipase A2 and their therapeutic potential: An update on patents (2012-2016). *Expert opinion on therapeutic patents*, 27(2), 217-225.
- Magrioti, V., & Kokotos, G. (2013). Phospholipase A2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: A patent review (2010–present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(3), 333-344.
- Matos, M., Vazquez, S., Santana, L., Uriarte, E., Fuentes, C., Santos, Y., & Muñoz, A. (2012). Looking for new targets: Simple coumarins as antibacterial agents. *Medicinal chemistry*, 8(6), 1140-1145.

- Matos, M., Vazquez, S., Santana, L., Uriarte, E., Fuentes-Edfuf, C., Santos, Y., & Muñoz-Crego, A. (2013). Synthesis and structure-activity relationships of novel amino/nitro substituted 3-arylcoumarins as antibacterial agents. *Molecules*, *18*(2), 1394-1404.
- Melima-Hage, L., Sampaio, S. V., Taft, C. A., & Silva, C. (2013). Phospholipase A2 inhibitors isolated from medicinal plants: Alternative treatment against snakebites. *Mini Rev Med Chem*, *13*(9), 1348-1356.
- Mohamed, R., V Shivaprasad, H., M Jameel, N., A Shekar, M., & S Vishwanath, B. (2011). Neutralization of local toxicity induced by viper russelli phospholipase A2 by lipophilic derivative of ascorbic acid. *Current topics in medicinal chemistry*, *11*(20), 2531-2539.
- Muthusamy, K., Chinnasamy, S., Nagarajan, S., & Sivaraman, T. (2018). Computational and in vitro insights on snake venom phospholipase A2 inhibitor of phyto compound ikshusterol3-O-glucoside of Clematis gouriana Roxb. Ex DC. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *36*(16), 4197-4208.
- Muthusamy, K., Chinnasamy, S., Nagarajan, S., Sivaraman, T., & Chinnasamy, S. (2017). Isolation and characterization of bioactive compounds of Clematis gouriana Roxb. Ex DC against snake venom phospholipase A2 (PLA2) computational and in vitro insights. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(9), 1936-1949.
- Nargotra, A., Sharma, S., Alam, M. I., Ahmed, Z., Bhagat, A., Taneja, S. C., Qazi, G. N., & Koul, S. (2011). In silico identification of viper phospholipaseA2 inhibitors: Validation by in vitro, in vivo studies. *Journal of molecular modeling*, *17*(12), 3063-3073.
- Nikolaou, A., Kokotou, M. G., Vasilakaki, S., & Kokotos, G. (2019). Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*(6), 941-956.

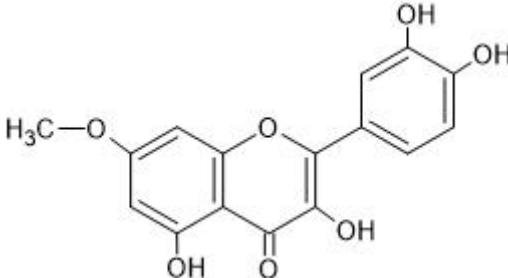
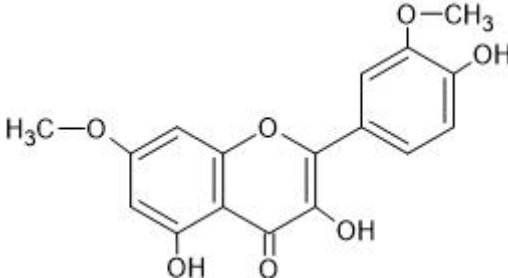
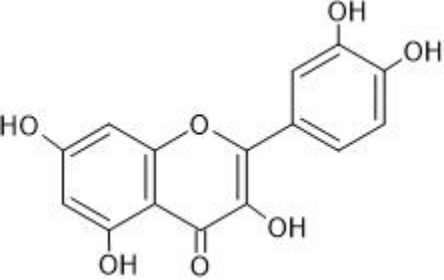
- Novo Belchor, M., Hessel Gaeta, H., Fabri Bittencourt Rodrigues, C., Ramos da Cruz Costa, C., de Oliveira Toyama, D., Domingues Passero, L. F., Dalastra Laurenti, M., & Hikari Toyama, M. (2017). Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A2. *Molecules*, 22(9), 1441.
- Pedada, S. R., Yarla, N. S., Tambade, P. J., Dhananjaya, B. L., Bishayee, A., Arunasree, K. M., Philip, G. H., Dharmapuri, G., Aliev, G., & Putta, S. (2016). Synthesis of new secretory phospholipase A2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 112, 289-297.
- Pereanez, J. A., Nunez, V., Patino, A. C., Londono, M., & Quintana, J. C. (2011). Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A2. *Vitae*, 18(3), 295-304.
- Pereañez, J. A., Patiño, A. C., Núñez, V., & Osorio, E. (2014). The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase A2. *Chemico-biological interactions*, 220, 94-101.
- Pisano, M. B., Kumar, A., Medda, R., Gatto, G., Pal, R., Fais, A., Era, B., Cosentino, S., Uriarte, E., & Santana, L. (2019). Antibacterial activity and molecular docking studies of a selected series of hydroxy-3-aryl coumarins. *Molecules*, 24(15), 2815.
- Quach, N. D., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2014). Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical pharmacology*, 90(4), 338-348.
- Rodrigues, C. F. B., Ferreira, M. J. P., Belchor, M. N., Costa, C. R., Novaes, D. P., dos Santos Junior, A. B., Tamayose, C. I., Pinho, M. V. T., de Oliveira, M. A., & Toyama, M. H. (2019). Evaluation of the inhibitory potential of Casuarictin, an Ellagitannin

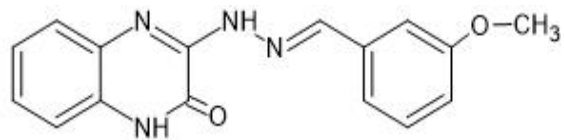
- isolated from White Mangrove (*Laguncularia racemosa*) leaves, on snake venom secretory phospholipase A2. *Marine drugs*, 17(7), 403.
- Sales, T. A., Marcussi, S., Da Cunha, E. F., Kuca, K., & Ramalho, T. C. (2017). Can inhibitors of snake venom phospholipases A2 lead to new insights into anti-inflammatory therapy in humans? A theoretical study. *Toxins*, 9(11), 341.
- Schaloske, R. H., & Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(11), 1246-1259.
- Shridas, P., Zahoor, L., Forrest, K. J., Layne, J. D., & Webb, N. R. (2014). Group X secretory phospholipase A2 regulates insulin secretion through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27410-27417.
- Su, M., & Chang, C. (1984). Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A2 activity (β -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon*, 22(4), 631-640.
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9), 290.
- Toyama, D., Marangoni, S., Diz-Filho, E., Oliveira, S., & Toyama, M. (2009). Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon*, 53(4), 417-426.
- Umar, S., Abubakar, A., Ibrahim, H., Sallau, B. A., & Natasha, O. (2014). Isolation of phospholipase A2 inhibitor from *Cryptolepis oblongifolia* (Meins) Schltr. *J Nat Sci Res*, 4(4), 63-67.
- Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World journal of biological chemistry*, 6(2), 28.

- Vasilakaki, S., Barbayianni, E., Leonis, G., Papadopoulos, M. G., Mavromoustakos, T., Gelb, M. H., & Kokotos, G. (2016). Development of a potent 2-oxoamide inhibitor of secreted phospholipase A2 guided by molecular docking calculations and molecular dynamics simulations. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(8), 1683-1695.
- Vazquez, S., López, R. L., Matos, M. J., Armesto, G., Serra, S., Uriarte, E., Santana, L., Borges, F., Crego, A. M., & Santos, Y. (2015). Design, synthesis and antibacterial study of new potent and selective coumarin–chalcone derivatives for the treatment of tenacibaculosis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(21), 7045-7052.
- Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., & Huang, C. (2017). Snake venom PLA2, a promising target for broad-spectrum antivenom drug development. *BioMed research international*, 2017.
- Ximenes, R. M., Alves, R. S., Pereira, T. P., Araújo, R. M., Silveira, E. R., Rabello, M. M., Hernandez, M. Z., Soares, V. C., Bristot, D., & Pires, C. L. (2012). Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A 2 from Bothrops pirajai venom. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-10.
- Xuemin, W. (2018). Phospholipases. En *Lipid Metabolism in Plants* (pp. 505-526). CRC Press.
- Zambelli, V. O., Pico, G., Fernandes, C. A., Fontes, M. R., & Cury, Y. (2017). Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins*, 9(12), 406.
- Zhang, S., Gong, W., Han, Z., Liu, Y., & Li, C. (2021). Insight into Shared Properties and Differential Dynamics and Specificity of Secretory Phospholipase A2 Family Members. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(13), 3353-3363.

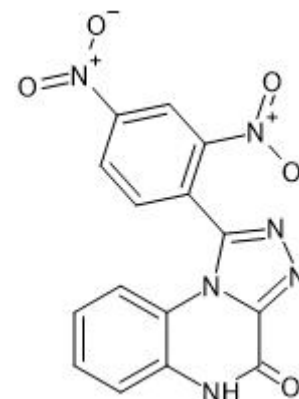
7. Anexos

Anexo 1. Búsqueda bibliográfica de moléculas con actividad inhibitoria frente a sPLA₂

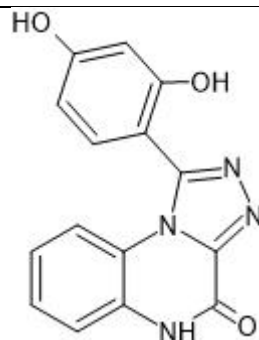
Evaluation of Rhamnetin as an Inhibitor of the Pharmacological Effect of Secretory Phospholipase A2	
 <p>Ramnetina</p>	 <p>Ramnazina</p>
 <p>Quercetina</p>	
Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (Novo Belchor et al., 2017)	
New quinoxalinone inhibitors targeting secreted phospholipase A2 and α-glucosidase	



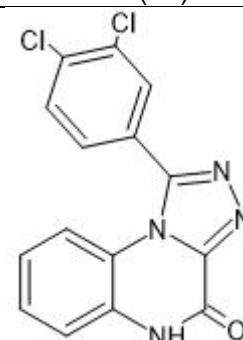
(E)-3-(2-(3-metoxibenciliden) hidrazinil) quinoxalin-2 (1H) -ona. (3f)



1-(2,4-dinitrofenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona. (4b)



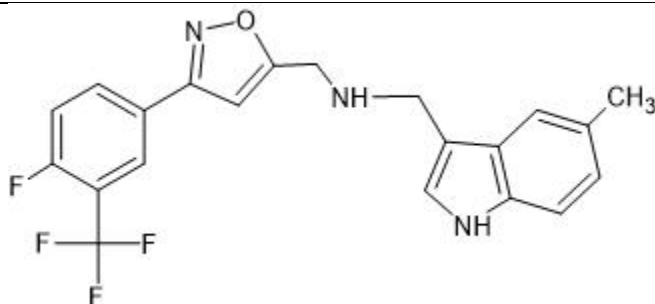
1-(2,4-Dihidroxifenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona. (4c)



1-(3,4-Diclorofenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona. (4d)

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de Alasmay et al., 2017

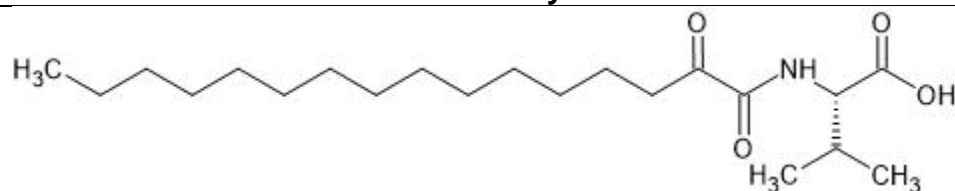
Synthesis of new secretory phospholipase A2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer Agents



(3-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl)isoxazol-5-yl)-N-((5-methyl-1H-indol-3-yl)methyl)methanamine

Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Pedada et al., 2016)

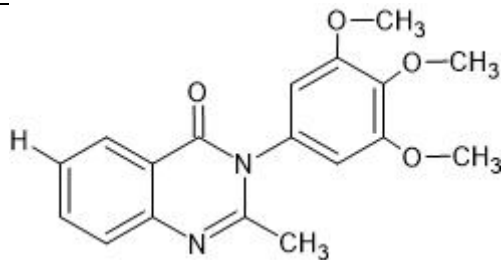
Development of a potent 2-oxoamide inhibitor of secreted phospholipase A2 guided by molecular docking calculations and molecular dynamics simulations



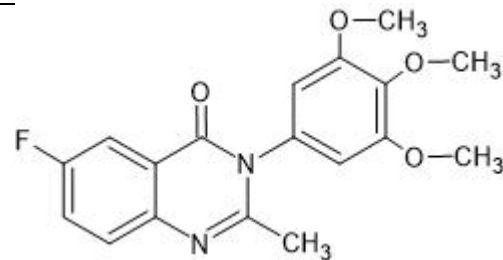
(S)-3-Methyl 2-(2-oxohexadecanamido)butanoic acid (16a)

Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Vasilakaki et al., 2016)

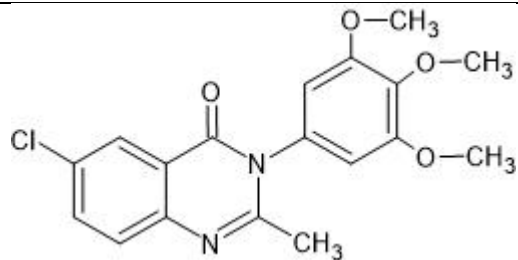
Synthesis and evaluation of anticancer, antiphospholipases, antiproteases, and antimetabolic syndrome activities of some 3H-quinazolin-4-one derivatives



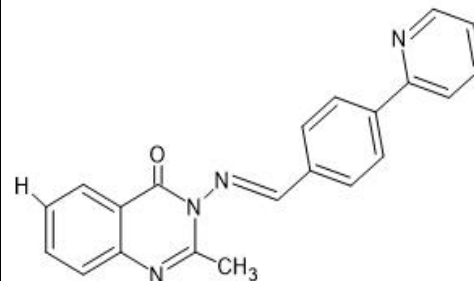
2-Metil-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (5a)



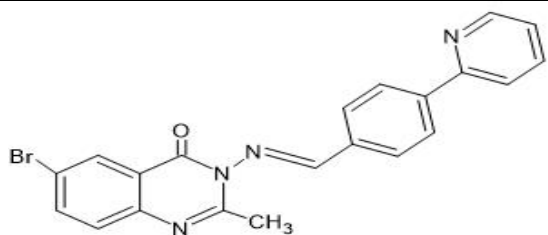
6-Fluoro-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (5b)



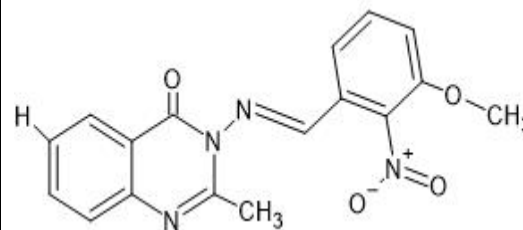
6-Cloro-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil) -3H-quinazolin-4-ona (5c)



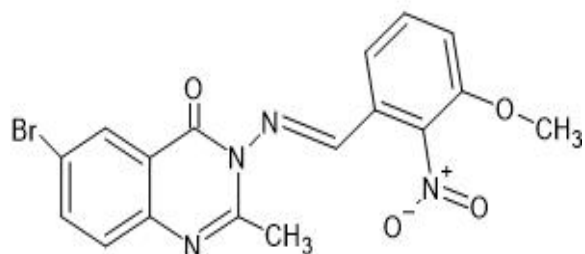
(E)-2-Metil-3-(4-piridin-2-il-benciliden) -amino] -3H-quinazolin-4-ona (8c)



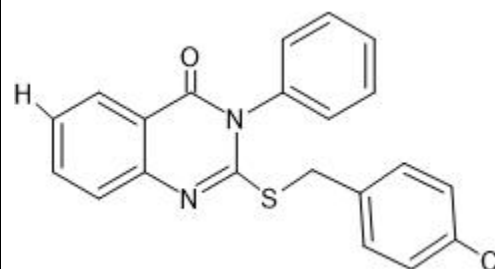
(E)-6-Bromo-2-metil-3-[(4-piridin-2-il-benciliden)-amino]-3H-quinazolin-4-ona (8d)



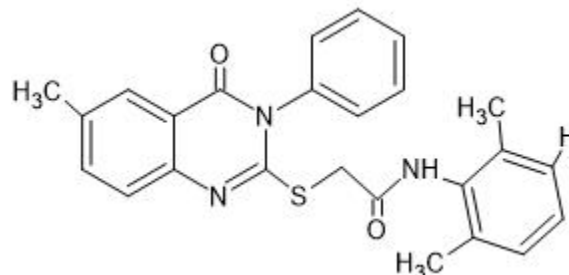
(E)-3-[(3-metoxi-2-nitro-benciliden) -amino]-2-metil-3H-quinazolin-4-ona (8e)



(E)-6-Bromo-3-[(3-metoxi-2-nitro-benciliden)-amino]-2-metil-3H-quinazolin-4-ona (8f)



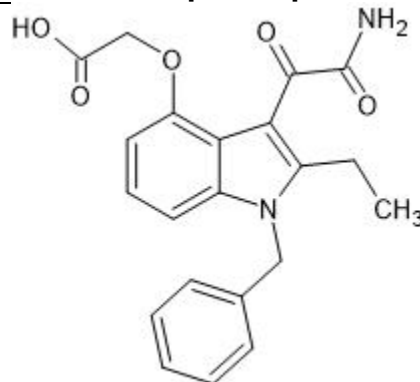
2-(4-cloro-bencilsulfanil)-6-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (15a)



N-(2,6-dimetil-fenil)-2-(6-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-ilsulfanil) -acetamida (15d)

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (El-Sayed et al., 2019)

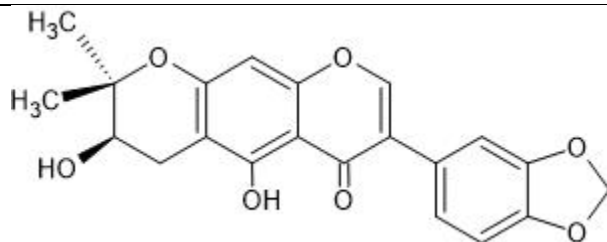
Inhibitors of phospholipase A2 and their therapeutic potential: an update on patents (2012-2016)



Varespladib

Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Kokotou et al., 2017)

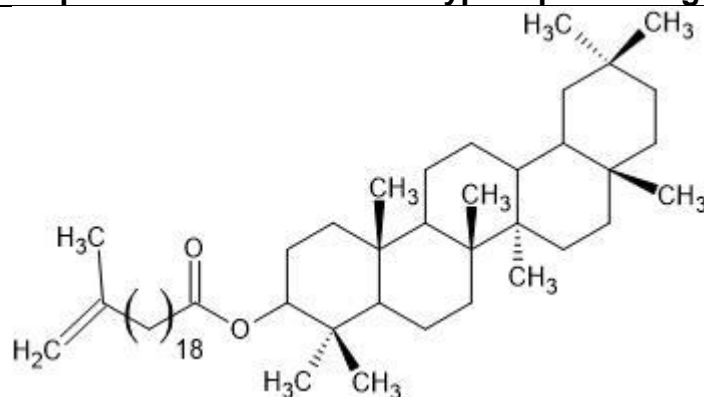
Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom



Harpalicina-2

Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de Ximenes et al., 2012

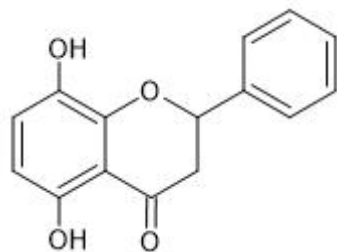
Isolation of Phospholipase A2 Inhibitor from *Cryptolepis oblongifolia* (Meins) Schltr



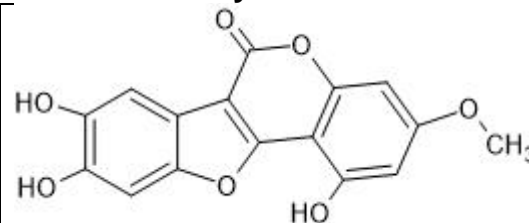
Oleanil erucoato

Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de Umar et al., 2014

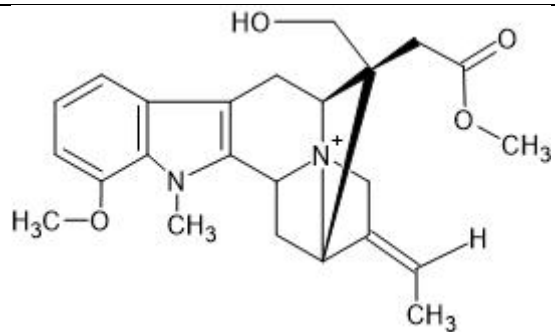
Snake Venom PLA_{2s} Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules



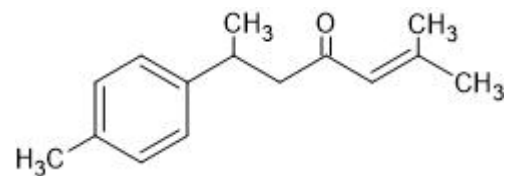
Primetina



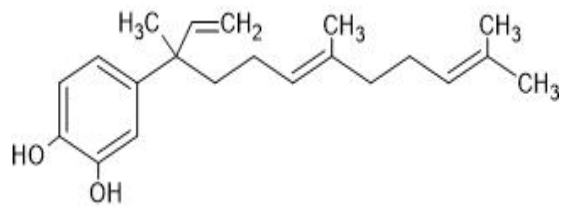
Wedelolactona



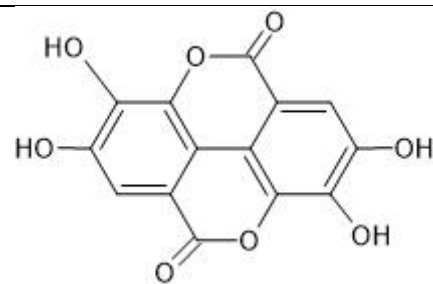
12-metoxi-Nb-metil-voachalotina



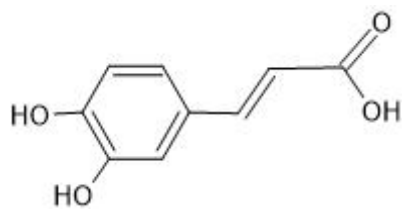
Ar-Turmeron



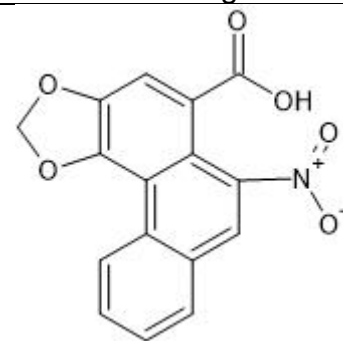
4-nerolidilcatecol



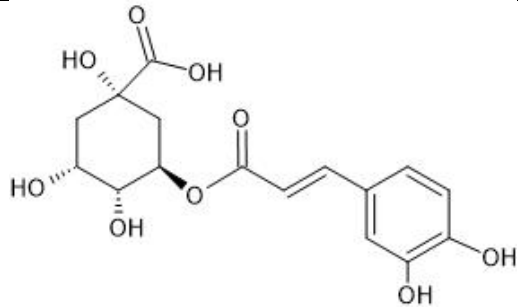
Ácido elágico



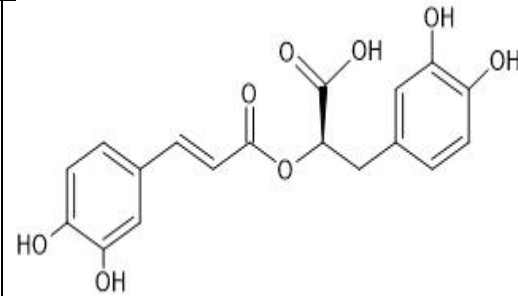
Ácido caféico



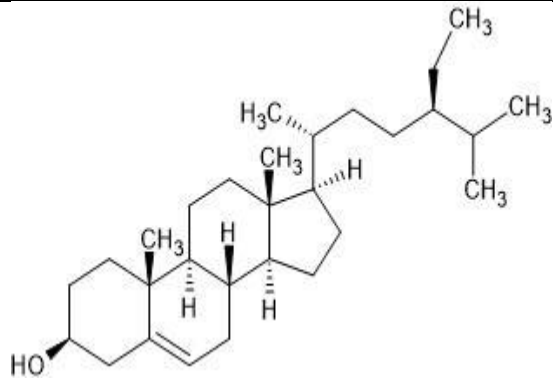
Ácido aristolóquico



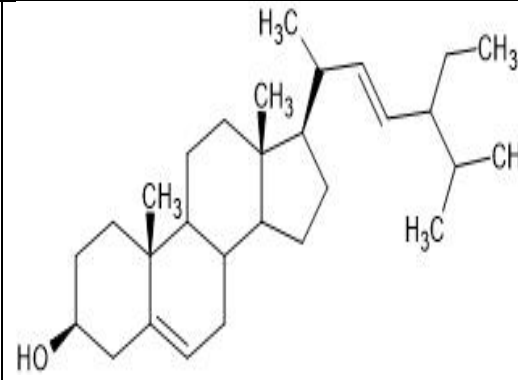
Ácido clorogénico



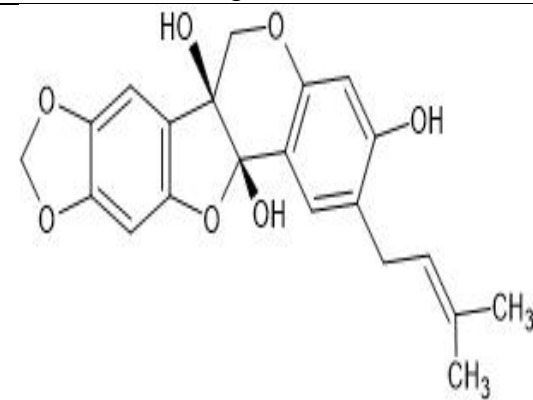
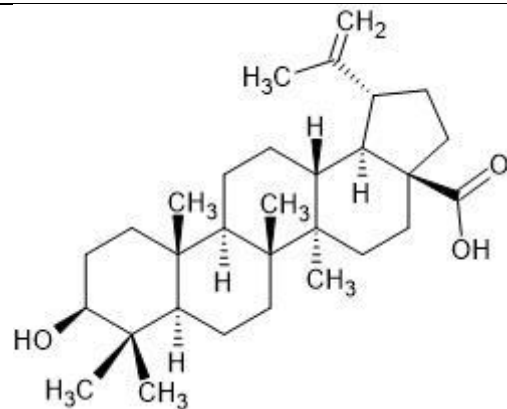
Ácido rosmarínico

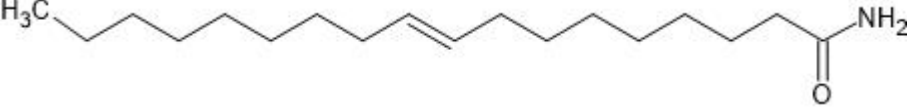
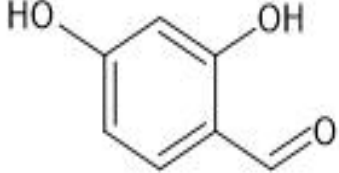
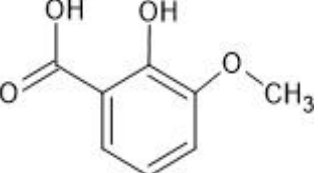
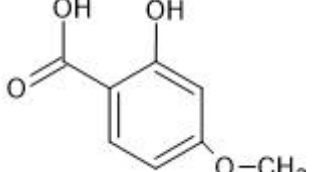
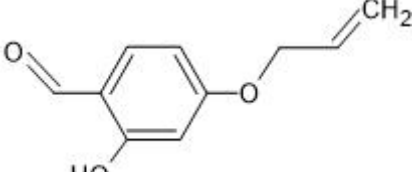
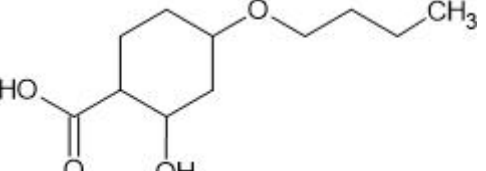
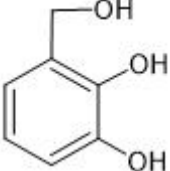


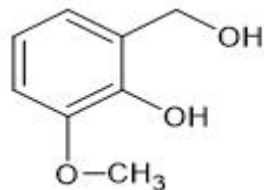
Sitosterol



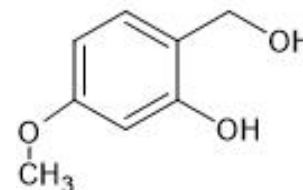
Stigmasterol



Ácido betulínico	Edunol
 <p data-bbox="955 386 1144 414">Elaidoilamida</p>	
<p data-bbox="191 418 1906 456">Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de Carvalho et al., 2013.</p>	
<p data-bbox="191 456 1906 532">Molecular modeling and snake venom phospholipase A2 inhibition by phenolic compounds: structure-activity relationship</p>	
 <p data-bbox="430 727 829 760">2, 4- dihidroxi benzaldehído</p>	 <p data-bbox="1260 727 1722 760">2- hidroxio-3-metoxibenzaldehído</p>
 <p data-bbox="399 959 850 992">2-hidroxio-4-metoxibenzaldehido</p>	 <p data-bbox="1260 959 1711 992">2- hidroxio-4-aliloxibenzaldehído</p>
 <p data-bbox="388 1192 861 1224">2- hidroxio-4-butiloxibenzaldehído</p>	 <p data-bbox="1291 1192 1680 1224">2, 3- dihidroxio-bencilalcohol</p>



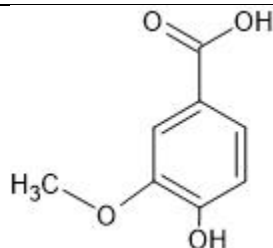
2-hidroxi-3-metoxi-bencilalcohol



2-hidroxi-4-metoxi-bencilalcohol

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de Alam et al., 2016

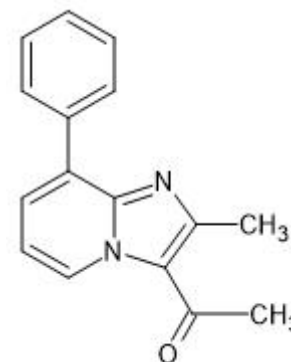
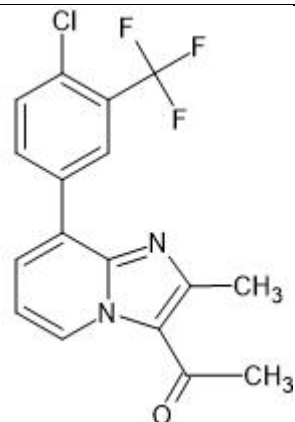
Can Inhibitors of Snake Venom Phospholipases A2 Lead to New Insights into Anti-Inflammatory Therapy in Humans? A Theoretical Study



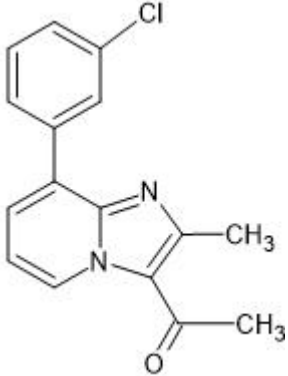
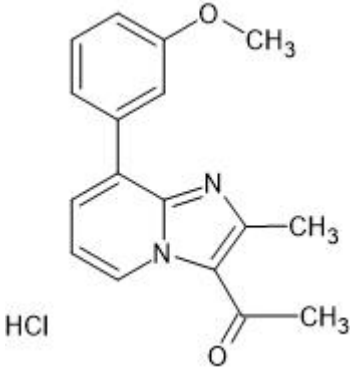
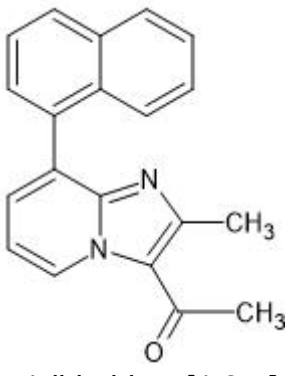
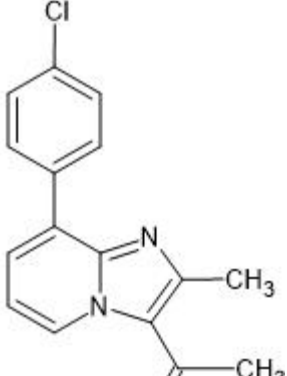
Ácido vainílico

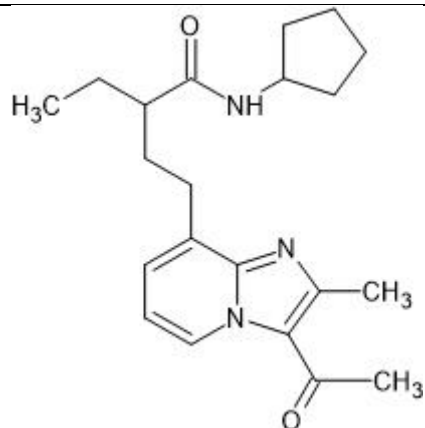
Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de Sales et al., 2017.

A One Pot Synthesis of Novel Bioactive Tri-Substitute-Condensed-Imidazopyridines that Targets Snake Venom Phospholipase A2

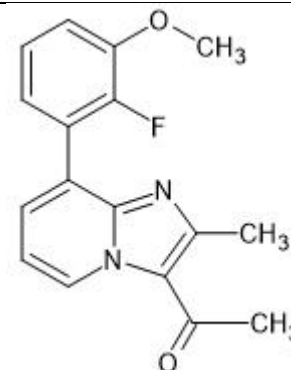


1-(2-Metil-8-fenil-imidazo[1,2- α]piridin-3-il)-etanona (3c)

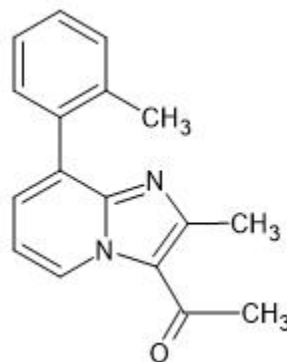
<p>1-[8-(4-Cloro-3-trifluorometil-fenil)-2-metil-imidazo[1,2-α]piridin-3-il]etanona (3a)</p>	
 <p>1-[8-(3-cloro-fenil)-2-metil-imidazo[1,2-α]piridina-3-yl]-etanona (3d)</p>	 <p>HCl 1-[8-(3-Metoxi-fenil)-2-metil-imidazo[1,2-α]piridin-3-il]-etanona (3e)</p>
 <p>1-(2-Metil-8-naftalen-1-il-imidazo[1,2-α]piridin-3-il)-etanona (3f)</p>	 <p>1-[8-(4-cloro-fenil)-2-metil-imidazo[1,2-α]piridina-3-il]-etanona (3g)</p>



4-(3-Acetyl-2-metil-imidazo[1,2- α]piridin-8-il)-N-ciclopentil-2-etil-butiramida (3h)



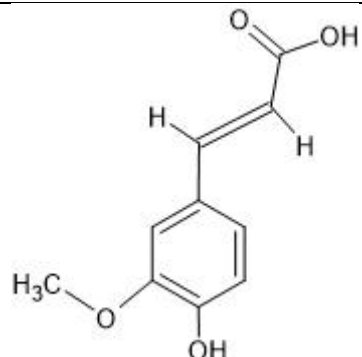
1-[8-(2-Fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metil-imidazo[1,2- α]piridin-3-il]-etanona (3i)



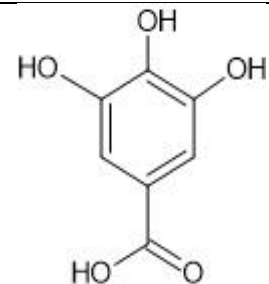
1-(2-Metil-8-o-tolil-imidazo[1,2- α]piridina-3-il)-etanona (3j)

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (Anilkumar et al., 2015)

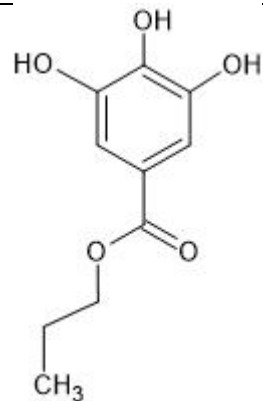
Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A2



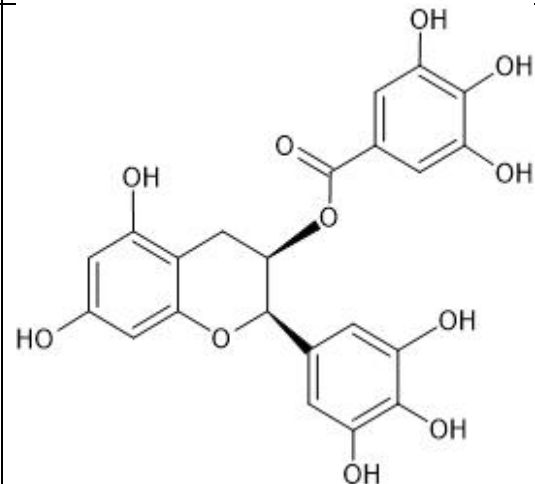
Ácido ferúlico



Ácido gálico



Propilgalato



Galato de epigalocatequina

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de Pereanez et al., 2011

The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase

A2

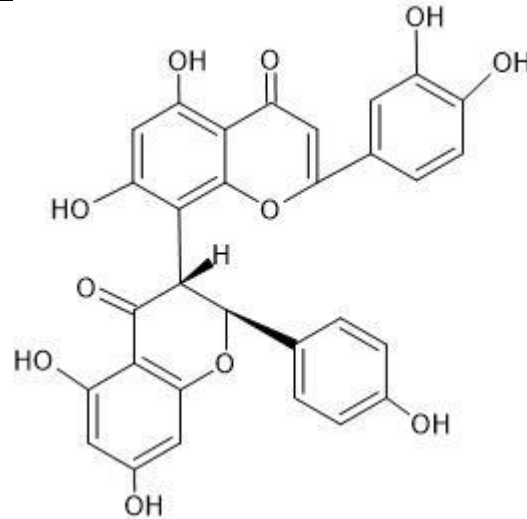


Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Pereañez et al., 2014)

Evaluation of the Inhibitory Potential of Casuarictin, an Ellagitannin Isolated from White Mangrove (*Laguncularia racemosa*) Leaves, on Snake Venom Secretory Phospholipase A2

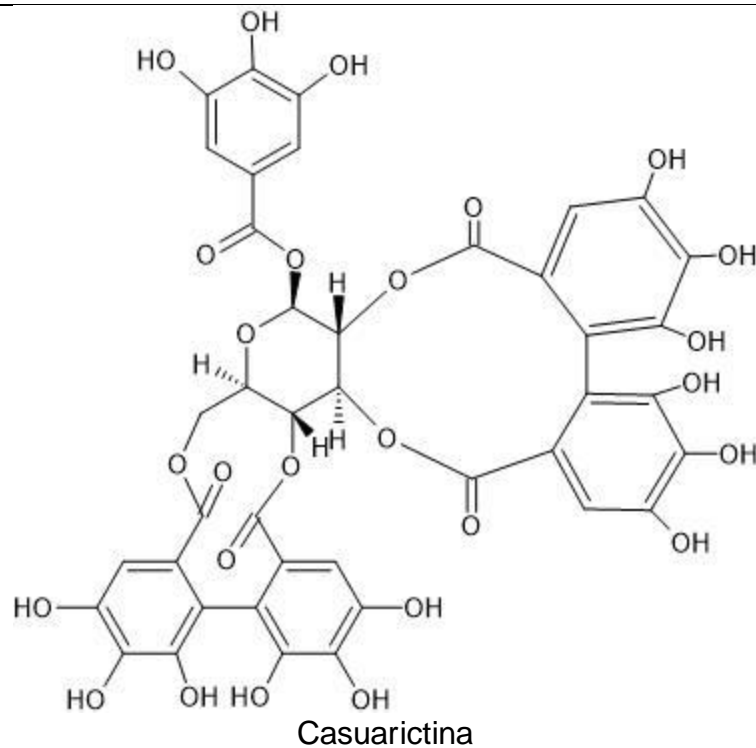
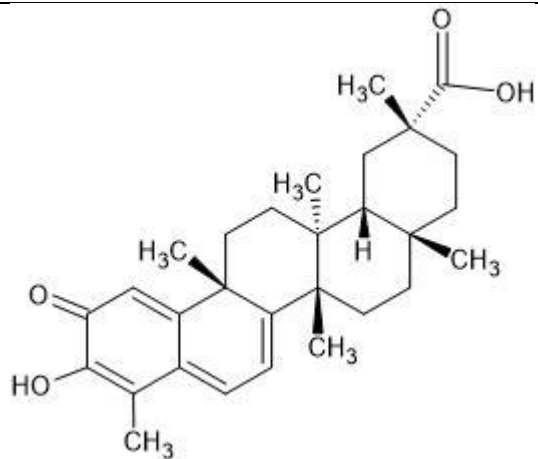
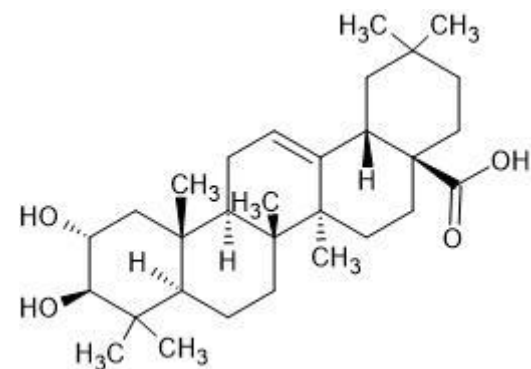


Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de Rodrigues et al., 2019

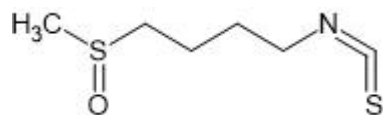
Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A2



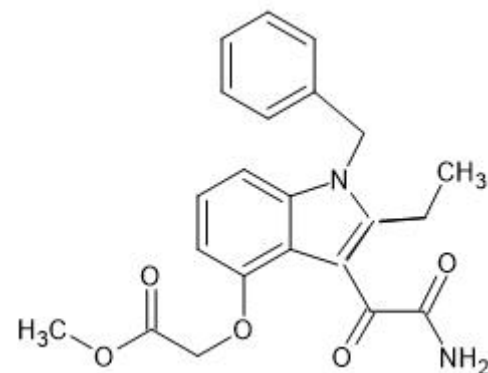
Celastrol



Ácido maslínico



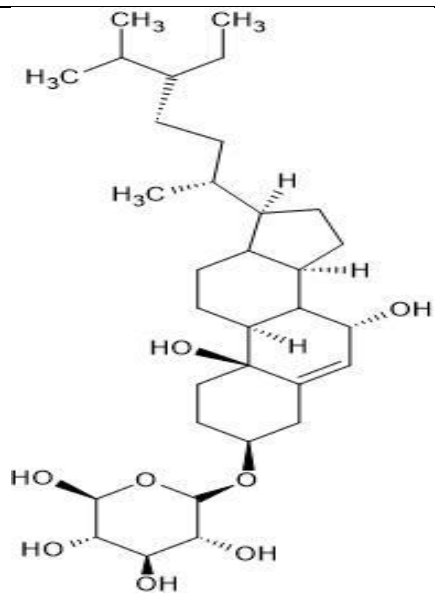
Sulforafano



Metil-vaespladib

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de Nikolaou et al., 2019

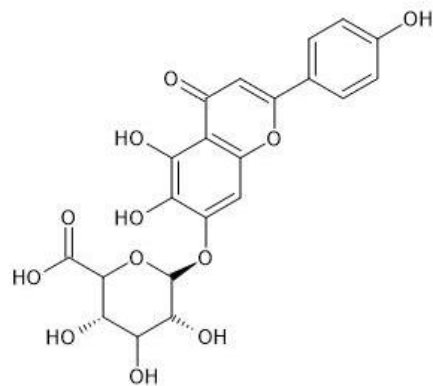
Computational and *in vitro* insights on snake venom phospholipase A2 inhibitor of phytocompound *ikshusterol*3-O-glucoside of *Clematis gouriana* Roxb. ex DC.



ikshusterol3-O-glucósido

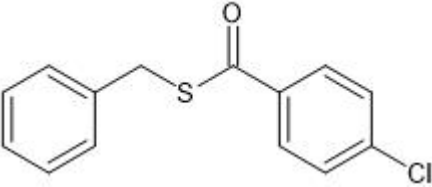
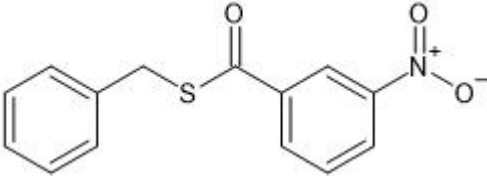
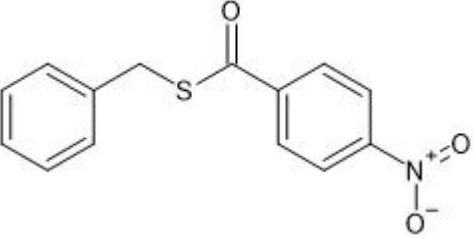
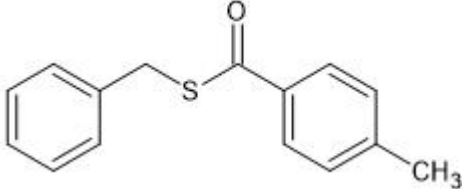
Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de Muthusamy et al., 2018

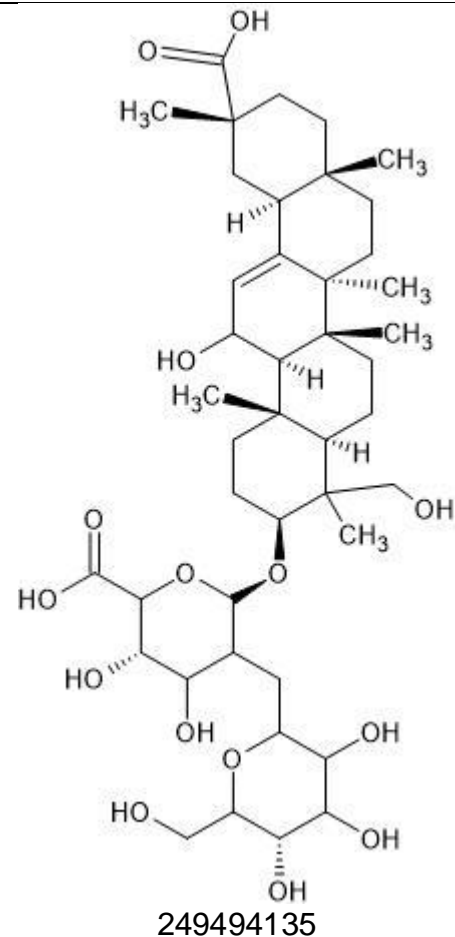
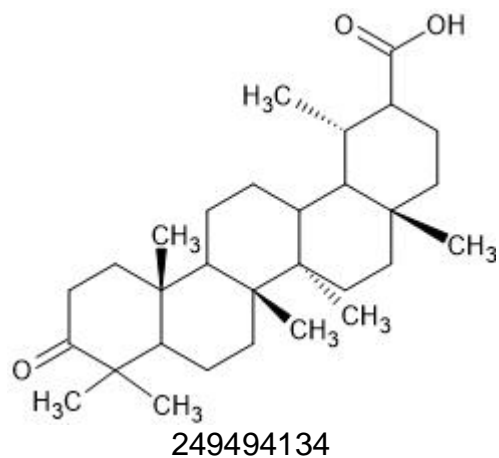
Combining in silico and in vitro approaches to identification of potent inhibitor against phospholipase A₂ (PLA₂)



Escutelarina

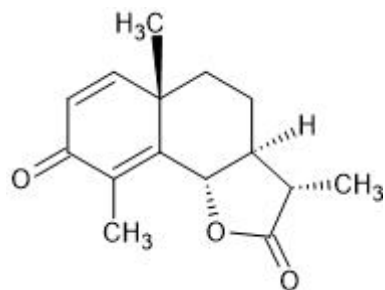
Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Chinnasamy et al., 2020)

Substituted thiobenzoic acid S-benzyl esters as potential inhibitors of a snake venom phospholipase A₂: Synthesis, spectroscopic and computational studies	
 <p>Éster S-bencílico del ácido 4-clorotiobenzoico</p>	 <p>Éster S-bencílico del ácido 3-nitrotiobenzoico</p>
 <p>Éster S-bencílico del ácido 4-nitrotiobenzoico</p>	 <p>Éster S-bencílico del ácido 4-metiltiobenzoico</p>
<p>Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de Castañeda et al., 2012</p>	
<p>Isolation and Characterization of Bioactive Compounds of <i>Clematis gouriana</i> Roxb. ex DC Against Snake Venom Phospholipase A₂ (PLA₂) Computational and In Vitro Insights</p>	

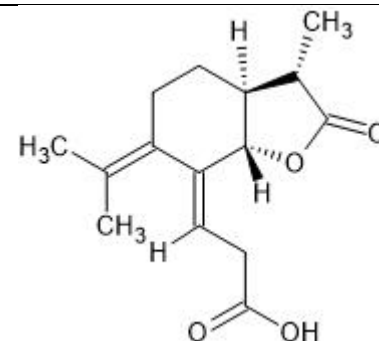


Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (Muthusamy et al., 2017)

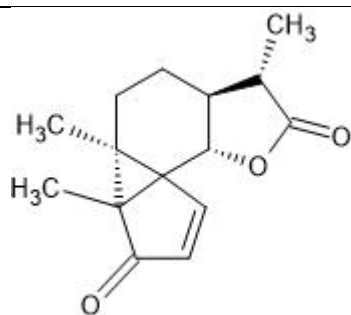
Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*



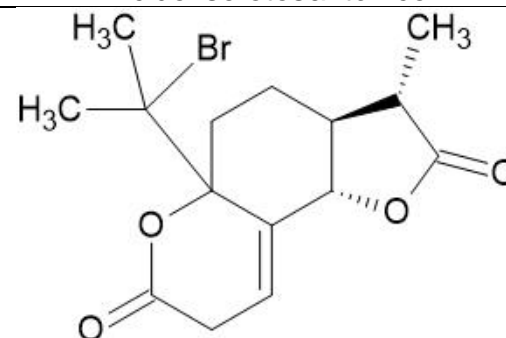
α -santonina



Ácido isofotosantónico



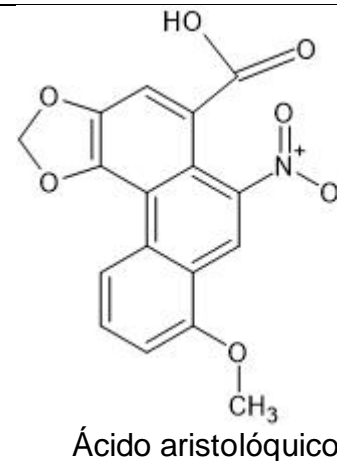
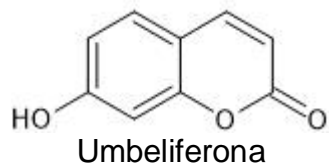
Luminosantonina



(3S)-5 α -(1-bromo-1-metiletil)-3-metil-3,3 α ,5,5 α ,8,9 β -hexahidro-4H-furo[2,3-f]cromen-2,7-diona

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (De Alvarenga et al., 2011)

Ethnomedicinal plants: A source of phytochemical compounds against snake venom PLA_{2s} activity



Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (Kankara et al., 2020)

Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality

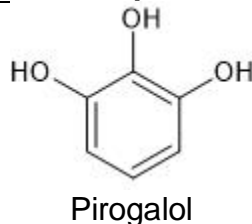


Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Gopi et al., 2015)

Neutralization of Local Toxicity Induced by *Vipera russelli* Phospholipase A2 by Lipophilic Derivative of Ascorbic Acid

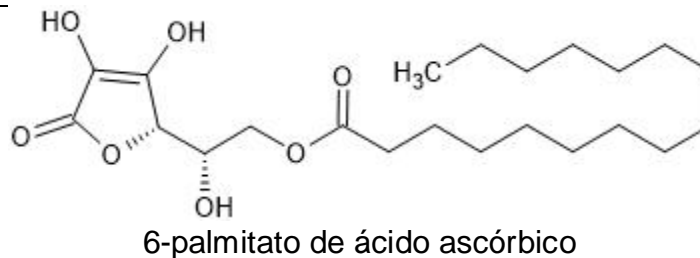
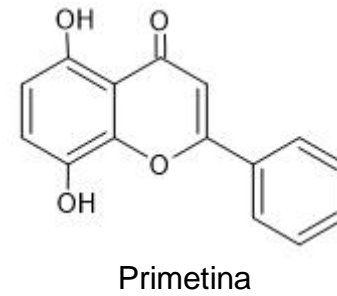
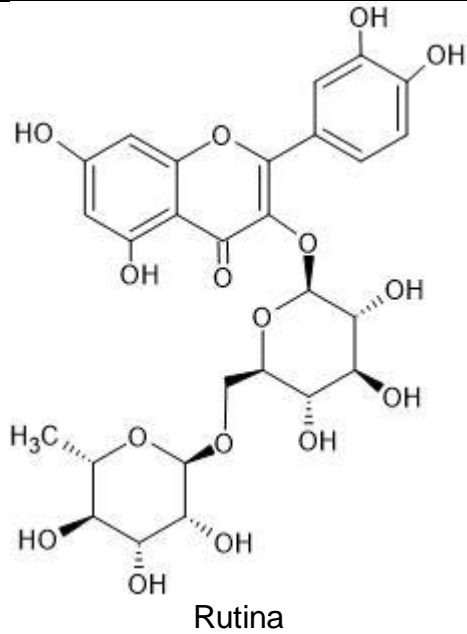
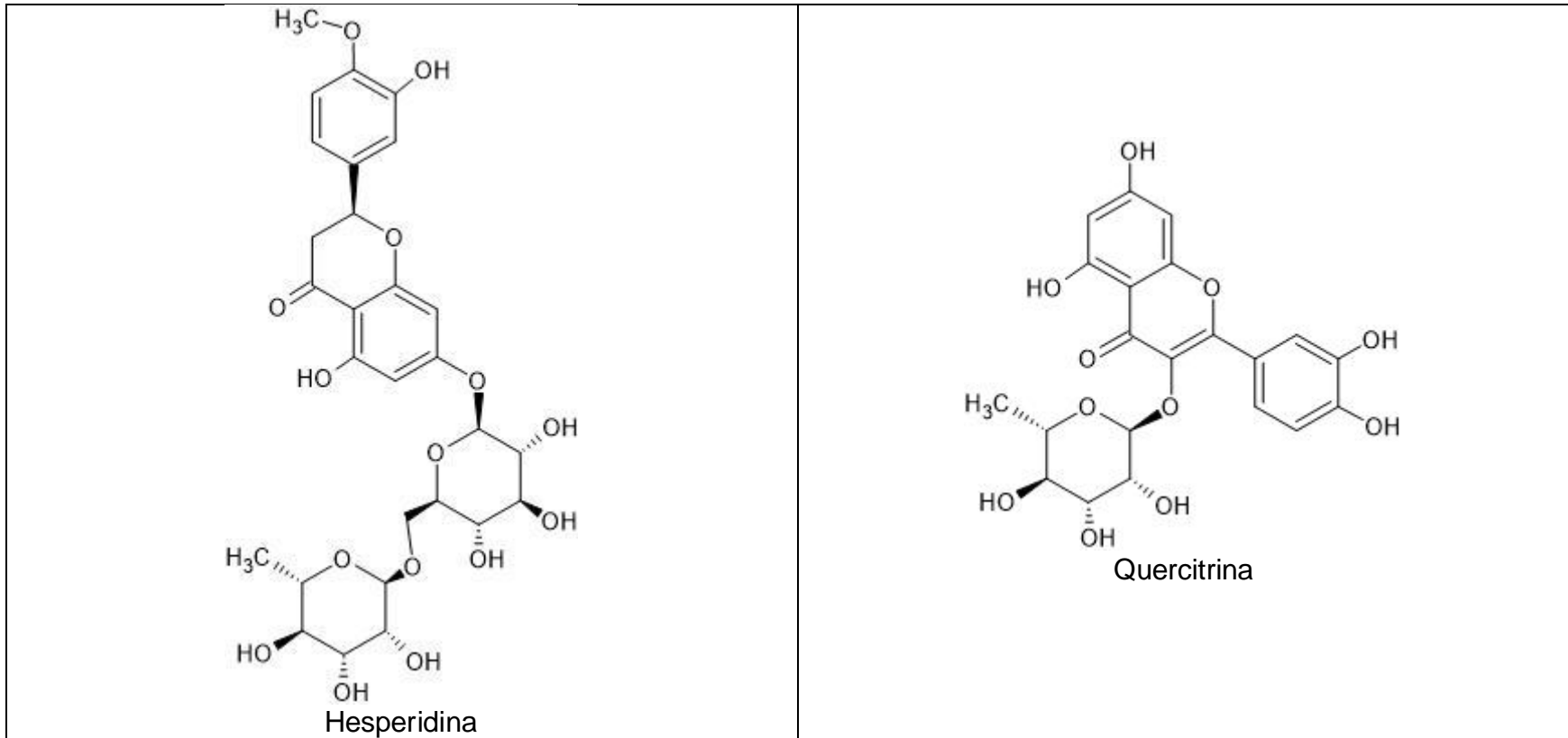
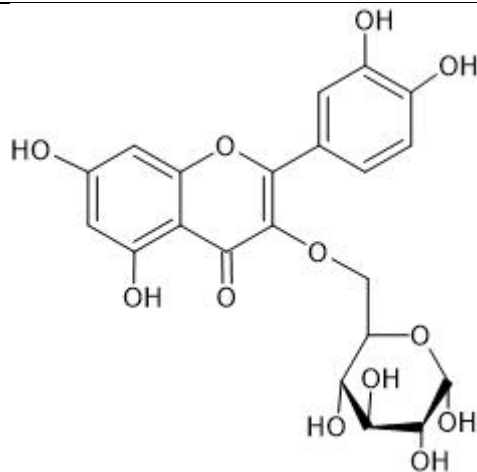


Gráfico diseñado con el Programa ACD/ChemSketch basado en el estudio de (Mohamed et al., 2011)

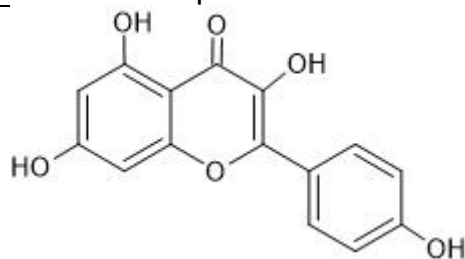
Phospholipase A2 Inhibitors Isolated from Medicinal Plants: Alternative Treatment Against Snakebites



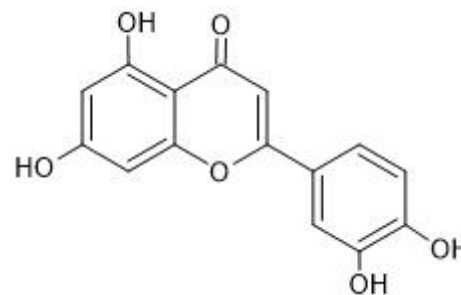




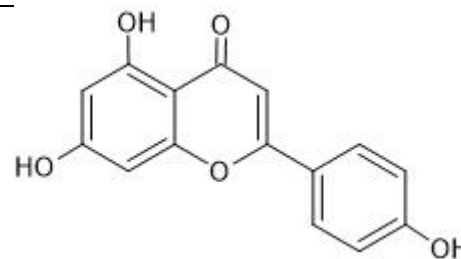
Isoquercitrina



Kaempferol



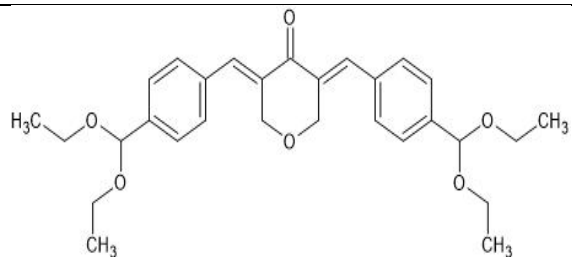
Luteolina



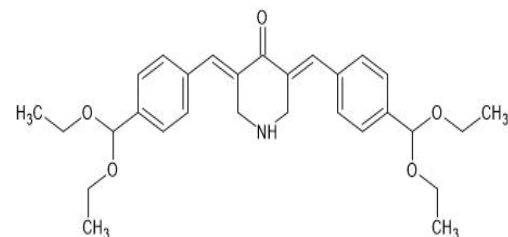
Apigenina

Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (Melima-Hage et al., 2013)

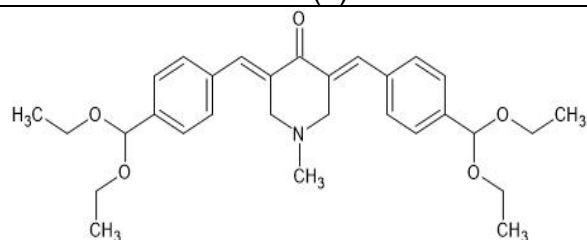
Pharmacological Evaluation and Docking Studies of α , β -Unsaturated Carbonyl Based Synthetic Compounds as Inhibitors of Secretory Phospholipase A2, Cyclooxygenases, Lipoxigenase and Proinflammatory Cytokines



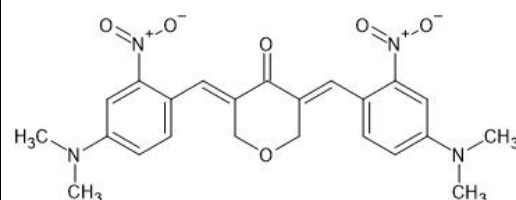
3,5-Bis-(4-diethoxymethyl-benzylidene)-tetrahydropyran-4-one (2)



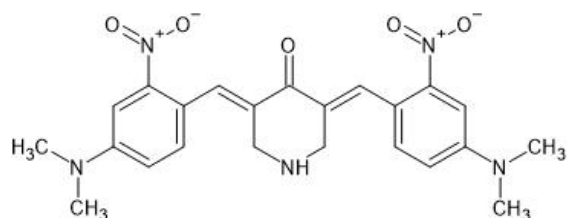
3,5-Bis[4-(diethoxymethyl)benzylidene]piperidin-4-one (3)



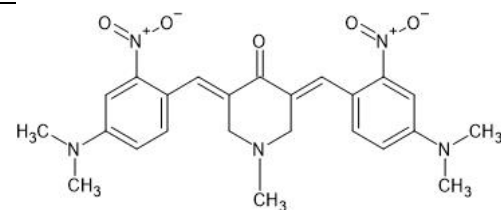
3,5-Bis[4-(diethoxymethyl)benzylidene]-1-methylpiperidin-4-one (4)



3,5-Bis[4-(dimethylamino)2-nitrobenzylidene]tetrahydropyran-4-one (12)



3,5-Bis[4-(dimethylamino)2-nitro-benzylidene]piperidin-4-one (13)

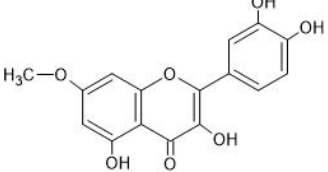
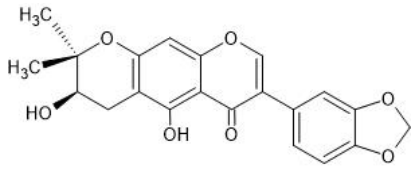
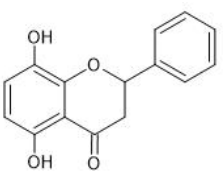
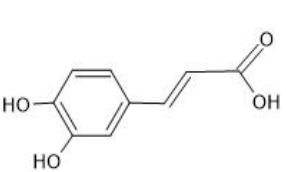
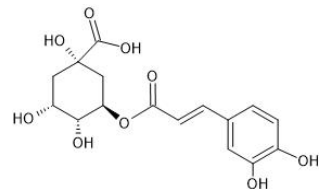
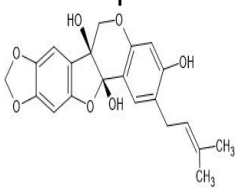
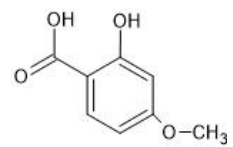
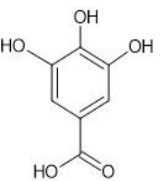
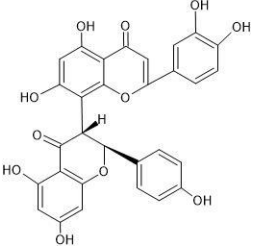
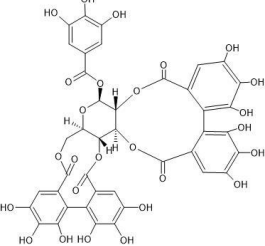
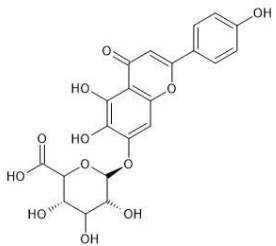
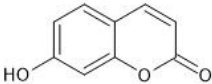
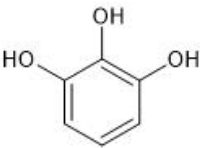
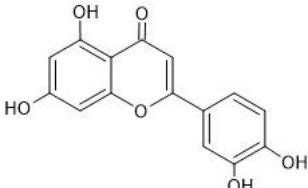


3,5-Bis[4-(dimethylamino)2-nitro-benzylidene]-1-methylpiperidin-4-one (14)

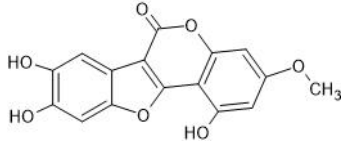
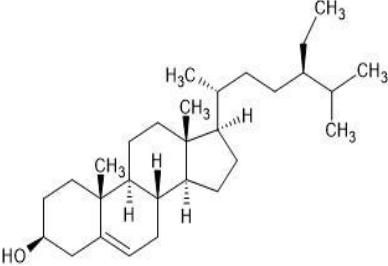
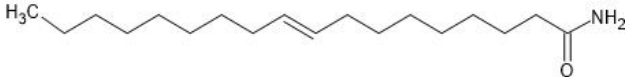
Gráficos diseñados con el Programa ACD/ChemSketch basados en el estudio de (Bukhari et al., 2014)

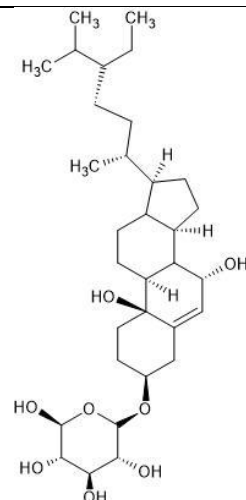
Anexo 2. Moléculas representativas clasificadas en productos naturales y sintéticos con actividad inhibitoria frente a sPLA₂ recopiladas de la literatura

PRODUCTOS NATURALES		
Metabolito secundario	Compuesto reportado con actividad anti sPLA ₂	Cita
Compuestos fenólicos	Ramnetina, Ramnazina, Quercetina	Novo Belchor et al., 2017
	Harpalicina-2	Ximenes et al., 2012
	Primetina, Ácido elágico, Ácido caféico, Ácido rosmarínico, Ácido clorogénico	Carvalho et al., 2013
	Edunol	
	2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído	Alam et al., 2016
	Ácido ferúlico, ácido gálico, propilgalato, galato de epigalocatequina	Pereanez et al., 2011
	Morelloflavona	Pereañez et al., 2014
	Casuarictina	Rodrigues et al., 2019
	Escutelarina	Chinnasamy et al., 2020
	Umbeliferona, ácido aristolóquico	Kankara et al., 2020
	Pirogalol	Gopi et al., 2015
Rutina, hesperidina, quercitrina, isoquercitrina, luteolina, kaempferol, apigenina.	Melima-Hage et al., 2013	
Principales estructuras químicas de los compuestos fenólicos con actividad anti sPLA ₂		

			
Ramnetina	Harpalicina-2	Primetina	Ácido caféico
			
Ácido clorogénico	Edunol	2-hidroxi-4metoxibenzaldehído	Ácidos gálico
			
Morelloflavona	Casuarictina	Escutelarina	Umbeliferona
			
Pirogalol	Quercitrina		
Terpenoides	Oleanil erucoato	(Umar et al., 2014)	
	Ar-Turmerona, 4-nerolidilcatecol, 12-metoxi-Nb-metil-voachalotina, ácido betunílico	(Carvalho et al., 2013)	

	Celastrol, ácido maslínico	(Nikolaou et al., 2019)
	SID 249494134 SID 249494135	(Muthusamy et al., 2017)
	A-santonina	(De Alvarenga et al., 2011)
Principales estructuras químicas de los terpenoides con actividad anti sPLA ₂		
<p>The image displays five chemical structures of terpenoids with anti-sPLA₂ activity. From top-left to bottom-right: 1. Oleanil-erucoato: A pentacyclic oleanane skeleton with a long erucic acid chain at C-28. 2. Ácido betunílico: A pentacyclic skeleton with a methyl group at C-13, a hydroxyl group at C-14, and a methyl group at C-15. 3. Celastrol: A pentacyclic skeleton with a methyl group at C-13, a hydroxyl group at C-14, and a methyl group at C-15, plus a side chain with a carboxylic acid group. 4. 249494134: A pentacyclic skeleton with a methyl group at C-13, a hydroxyl group at C-14, and a methyl group at C-15, plus a side chain with a carboxylic acid group. 5. a-santonina: A pentacyclic skeleton with a methyl group at C-13, a hydroxyl group at C-14, and a methyl group at C-15, plus a side chain with a carboxylic acid group.</p>		
Heterocíclicos	Wedelolactona	(Carvalho et al., 2013)
Estructura química de los heterocíclicos con actividad anti sPLA ₂		

 <p>Wedelolactona</p>		
Fitosteroles	Citosterol, Stigmasterol	(Carvalho et al., 2013)
Estructura química de los fitosteroles con actividad anti sPLA ₂		
 <p>Citosterol</p>		
Amidas	Elaidoilamida	(Carvalho et al., 2013)
Estructura química de las amidas con actividad anti sPLA ₂		
 <p>Elaidoilamida</p>		
Glucósidos	Ikshusterol3-O-glucósido	(Muthusamy et al., 2018)
Estructura química de los glucósidos con actividad anti sPLA ₂		



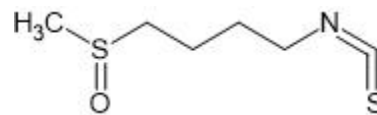
ikshusterol3-O-glucósido

Organosulfurado

Sulforafano

(Nikolaou et al., 2019)

Estructura química de los organosulfurado con actividad anti sPLA₂



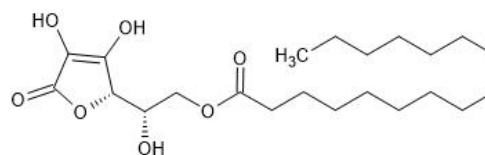
Sulforafano

Ésteres de ácido graso

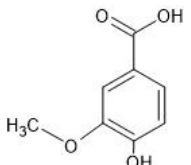
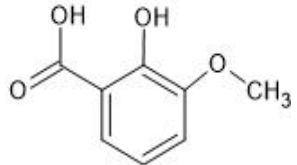
6-palmitato de ácido ascórbico

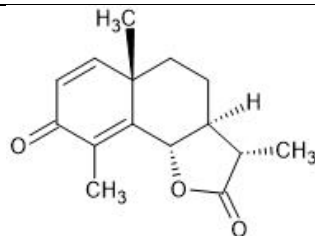
Mohamed et al., 2011

Estructura química de los ésteres de ácido graso con actividad anti sPLA₂



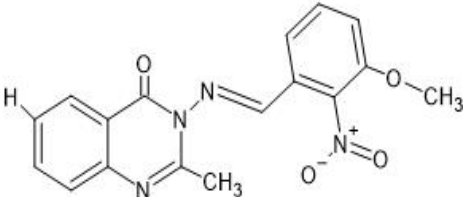
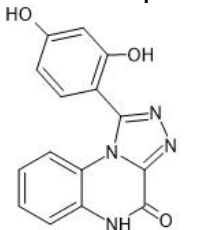
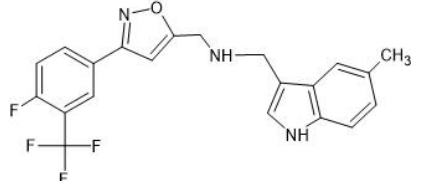
6-palmitato de ácido ascórbico

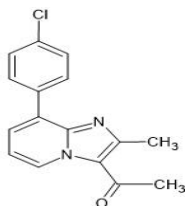
Bencenoides	Ácido vainillico	Sales et al., 2017
Estructura química de los bencenoides con actividad anti sPLA ₂		
 <p>Ácido vainillico</p>		
COMPUESTOS SINTÉTICOS		
Fenoles	2, 4-dihidroxibenzaldehído, 2- hidroxí-3-etoxibenzaldehído 2-hidroxí-4-aliloxybenzaldehído 2-hidroxí-4-butíloxybenzaldehído 2,3-dihidroxí-bencilalcohol, 2-hidroxí-3-metoxí-bencilalcohol	Alam et al., 2016
Estructura química de los fenoles con actividad anti sPLA ₂		
 <p>2-hidroxí-3-metoxíbenzaldehído</p>		
Terpenoides	Ácido isofotosantónico, Luminosantonina, (3S)-5 α -(1-bromo-1-metiletíl)-3-metil-3,3 α ,5,5 α ,8,9 β -hexahidro-4H-furo[2,3-f]cromen-2,7-diona	De Alvarenga et al., 2011
Estructura química de los terpenoides con actividad anti sPLA ₂		



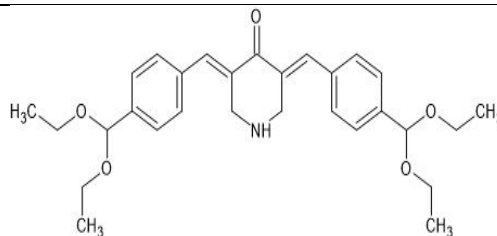
α -santonina

Heterocíclicos	(E) -3- (2- (3-metoxibenciliden) hidrazinil) quinoxalin-2 (1H) -ona 1- (2,4-dinitrofenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona 1- (2,4-Dihidroxifenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona 1- (3,4-Diclorofenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona	Alasmary et al., 2017
	(3-(4-fluoro-3-(trifluorometil) fenil) isoxazol-5-il) -N-((5-metil-1H-indol-3- il) metil) metanamina	Pedada et al., 2016
	2-Metil-3- (3,4,5-trimetoxi-fenil) -3H-quinazolin-4-ona 6-Fluoro-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil) -3H-quinazolin-4-ona 6-Cloro-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil) -3H-quinazolin-4-ona (E)-2-Metil-3-(4-piridin-2-il-benciliden) -amino] -3H-quinazolin-4-ona (E)-6-Bromo-2-metil-3-[(4-piridin-2-il-benciliden)-amino]-3H-quinazolin-4-ona (E) -3 - [(3-metoxi-2-nitro-benciliden) -amino]-2-metil-3H-quinazolin-4-ona (E)-6-Bromo-3-[(3-metoxi-2-nitro-benciliden)-amino]-2-metil-3H-quinazolin-4-ona 2-(4-cloro-bencilsulfanil)-6-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona N-(2,6-dimetil-fenil) -2-(6-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-ilsulfanil) -acetamida	El-Sayed et al., 2019
	1-[8-(4-Cloro-3-trifluorometil-fenil)-2-metil-imidazo[1,2- α]piridin-3-il]etanona 1-(2-Metil-8-fenil-imidazo[1,2- α]piridin-3-il)-etanona 1-[8-(3-cloro-fenil)-2-metil-imidazo[1,2- α]piridina-3-yl]-etanona 1-[8-(3-Metoxi-fenil)-2-metil-imidazo[1,2- α]piridin-3il]-etanona 1-(2-Metil-8-naftalen-1-il-imidazo[1,2- α]piridin-3-il)-etanona 1-[8-(4-cloro-fenil)-2-metil-imidazo[1,2- α]piridina-3-il]-etanona	Anilkumar et al., 2015

	<p>4-(3-Acetil-2-metil-imidazo[1,2-α]piridin-8-il)-N-ciclopentil-2-etil-butiramida 1-[8-(2-Fluoro-3-metoxi-fenil)-2-metil-imidazo[1,2-α]piridin-3-il]-etanona 1-(2-Metil-8-o-tolil-imidazo[1,2-α] piridina-3-il) -etanona</p>	
	<p>3,5-Bis- (4-dietoximetil-bencilideno) -tetrahidropiran-4-ona 3,5-bis [4- (dietoximetil) benciliden] piperidin-4-ona 3,5-Bis [4- (dietoximetil) benciliden] -1-metilpiperidin-4-ona 3,5-Bis [4- (dimetilamino) 2-nitrobenciliden] tetrahidro-piran-4-ona 3,5-Bis [4- (dimetilamino) 2-nitro-benciliden] piperidin4-ona 3,5-Bis [4- (dimetilamino) 2-nitro-benciliden] -1-metil-piperidin-4-ona</p>	<p>Bukhari et al., 2014</p>
<p>Estructura química de los compuestos heterocíclicos con actividad anti sPLA₂</p>		
		
<p>(E)-3-[(3-metoxi-2-nitro-benciliden)-amino]-2-metil-3H-quinazolin-4-ona</p>	<p>1- (2,4-Dihidroxi-fenil) - [1,2,4] triazolo [4,3-a] quinoxalin-4 (5H) -ona</p>	<p>(3- (4-fluoro-3-(trifluorometil) fenil) isoxazol-5-il) -N-((5-metil-1H-indol-3-il) metil)metanamina</p>



1-[8-(4-cloro-fenil)-2-metil-imidazo[1,2- α]piridina-3-il]-etanona



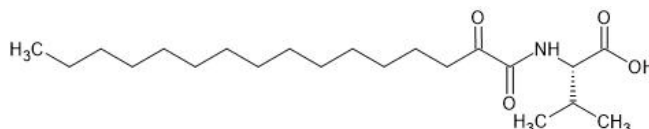
3,5-bis [4- (diethoximetil) benciliden] piperidin-4-ona

Ácido carboxílico

Ácido (S) -3-metil 2- (2-oxohexadecanamido) butanoico

Vasilakaki et al.,
2016

Estructura química de las amidas con actividad anti sPLA₂



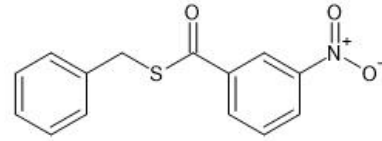
Ácido (S) -3-metil 2- (2-oxohexadecanamido) butanoico

Ésteres

Éster S-bencílico del ácido 4-clorotiobenzoico
Éster S-bencílico del ácido 3-nitrotiobenzoico
Éster S-bencílico del ácido 4-nitrotiobenzoico
Éster S-bencílico del ácido 4-metiltiobenzoico

Castañeda et al.,
2012

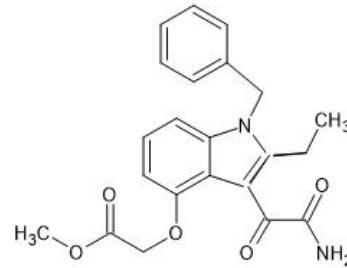
Estructura química de los ésteres con actividad anti sPLA₂



Éster S-bencílico del ácido 3-nitrobenzoico

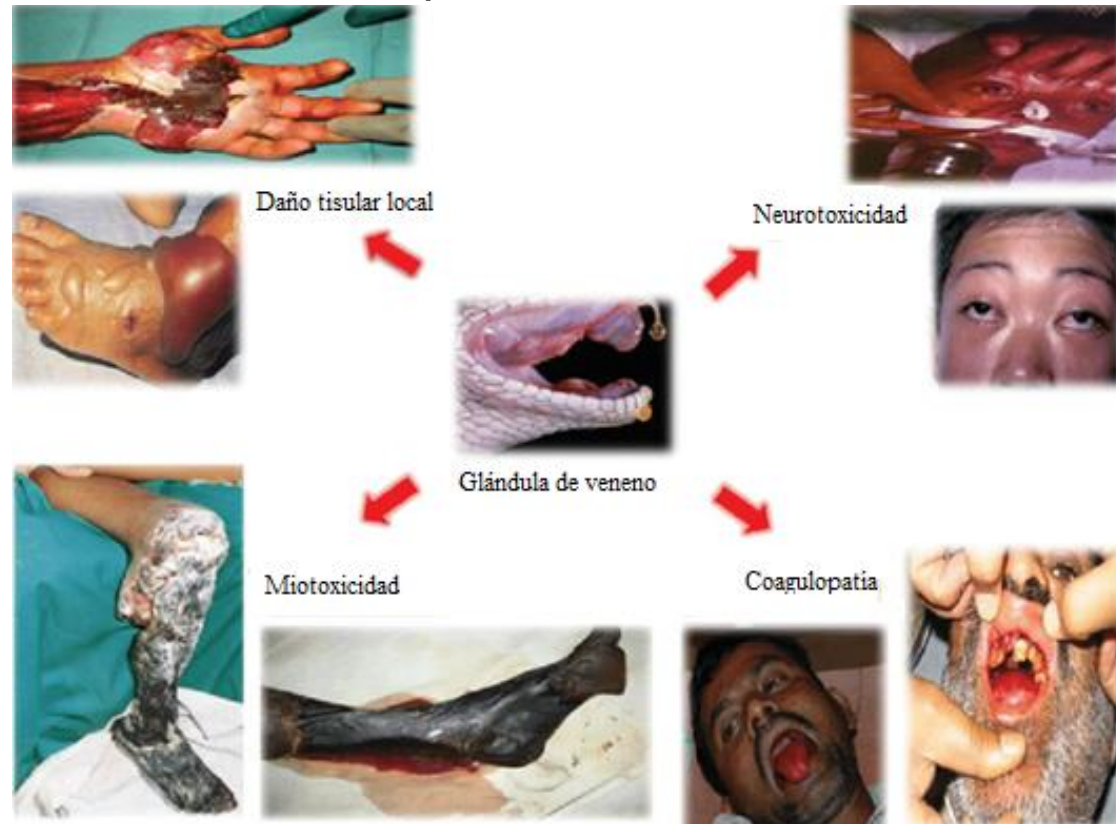
Bencenoides	Varespladib	(Kokotou et al., 2017)
	Metil-varespladib	Nikolaou et al., 2019

Estructura química de los bencenoides con actividad anti sPLA₂





Metil-varespladib


Anexo 3. Efectos tóxicos de los venenos de serpientes








Nota. Tomado de Urs et al.,2014. Implications of phytochemicals in snakebite management: present status and future prospective. Toxin Reviews, 33 (3), p. 65. (<http://doi.org/10.3109/15569543.2013.854255>) Derechos reservados © 2021 Taylor & Francis.

Anexo 4. Imágenes ilustrativas de especies de cada familia del estudio

Especies	Fotos	Referencias
<i>Bothrops moojeni</i>	 <p data-bbox="669 534 808 576"><small>Bothrops moojeni Brazil, Tocantins, Jalapão © Laurie Vitt</small></p>	<p data-bbox="1213 537 1787 570">Tomada de Vitt, L. (s. f.). <i>Bothrops moojeni</i>.</p> <p data-bbox="1213 602 1835 834">The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=moojeni&search_param=%28%28taxon%3D%27Viperidae%27%2Cexact%29%29</p>
<i>Bothrops jararacussu</i>	 <p data-bbox="669 1222 869 1268"><small>Bothrops jararacussu Brazil, Iguape State of Sao Paulo © Marcelo Ribeiro Duarte</small></p>	<p data-bbox="1213 943 1724 1040">Tomada de Ribeiro, M. (s. f.). <i>Bothrops jararacussu</i>. The Reptile Database.</p> <p data-bbox="1213 1073 1835 1240">https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=jararacussu&search_param=%28%28</p>

		<p>28taxon%3D%27Viperidae%27%2Cexact%29%29</p>
<p><i>Bothrops bilineatus</i> <i>bilineatus</i></p>	<p>Bothrops bilineatus bilineatus Brazil © Marco A Freitas</p> 	<p>Tomada de Freitas, M. (s. f.). Bothrops bilineatus bilineatus. The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=bilineatus&search_param=%28%28taxon%3D%27Viperidae%27%2Cexact%29%29</p>
<p><i>Bothrops brazili</i></p>		<p>Tomada de Torres-Carvajal, Omar. Torres, O. (2020, 12 mayo). Reptiles del Ecuador. BIOWEB. https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrops%20brazili</p>

<p><i>Crotalus durissus terrificus</i></p>		<p>Tomada de Misioneros Pr. (s. f.). The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Crotalus&species=durissus&search_param=%28%28taxon%3D%27Viperidae%27%2Cexact%29%29</p>
<p><i>Crotalus atrox</i></p>		<p>Tomada de Jandzik, D. (s. f.). <i>Crotalus atrox</i> The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Crotalus&species=atrox&search_param=%28%28taxon%3D%27Viperidae%27%2Cexact%29%29</p>
<p><i>Crotalus viridis viridis</i></p>		<p>Tomada de Pierson, Todd. (s. f.). <i>Crotalus viridis viridis</i> The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Crotalus</p>

		&species=viridis&search_param=%28%28taxon%3D%27Viperidae%27%2Cexact%29%29
<i>Micrurus surinamensis</i>		Tomada de Duarte, R. (s. f.). <i>Micrurus surinamensis</i> The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Micrurus&species=surinamensis&search_param=%28%28genus%3D%27Micrurus%27%2Cexact%29%29
<i>Micrurus frontalis</i>		Tomada de Velho, D. (s. f.). <i>Micrurus frontalis</i> The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Micrurus&species=frontalis&search_param=%28%28genus%3D%27Micrurus%27%2Cexact%29%29

Micrurus spixxi



Tomada de Franzen, M. (s. f.). *Micrurus spixxi*. The Reptile Database. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Micrurus&species=spixxi&search_param=%28%28genus%3D%27Micrurus%27%2Cexact%29%29