

Inhibición de enzimas fosfolipasas A₂ de venenos totales de serpientes como estrategia en la búsqueda de nuevos fármacos

Enzyme phospholipase A₂ inhibition from snake venoms as strategy to search for new drug

Geovanny Barrera-Luna^{1*}, <https://orcid.org/0000-0003-2732-2897>
María-Elena Cazar², <https://orcid.org/0000-0001-5228-3514>

¹Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador

²Departamento de Química Aplicada y Sistemas de Producción, Grupo de Biotecnología y Biodiversidad. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

*Autor para correspondencia: gbarrera@uazuay.edu.ec

FECHA DE RECEPCIÓN: 12 FEBRERO 2023
2023

FECHA DE ACEPTACIÓN: 12 JUNIO

RESUMEN

Introducción: Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son ampliamente utilizados para la terapia del dolor, a pesar de sus efectos secundarios que ocurren a nivel renal, estomacal y coagulatorio. Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes, abejas e incluso en el organismo humano, son responsables de varios procesos fisiológicos y patológicos. Las enzimas hidrolizan fosfolípidos de membrana liberando ácido araquidónico, un precursor de los eicosanoides pro-inflamatorios, los cuales originan mediadores de la inflamación.

Objetivo: El propósito de este trabajo es revisar nuevas moléculas capaces de bloquear la escisión de los fosfolípidos de membrana por acción de las PLA₂, evitando la formación de mediadores de inflamación.

Metodología: Se realizó una revisión bibliográfica de estudios publicados desde 2011 a 2021, que reportan compuestos con actividad inhibitoria frente a PLA₂. El potencial de los estudios de relación estructura actividad se discute como estrategia para encontrar compuestos activos ante PLA₂. **Resultados:** Se revisaron 26 estudios que incluyen compuestos naturales y sintéticos y se recopilaron 93 moléculas con actividad inhibitoria, destacando su potencial como inhibidores de PLA₂.

Conclusiones: La actividad inhibitoria de los compuestos revisados podría estar asociada a los patrones de sustitución en el anillo bencénico de las moléculas. La evaluación de

características moleculares relevantes en la inhibición de PLA₂ puede guiar a la identificación de candidatos para síntesis de nuevos inhibidores enzimáticos.

Palabras clave: Fosfolipasas A₂, inflamación, actividad enzimática, inhibición.

ABSTRACT

Introduction: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used for pain therapy, despite its side effects in renal, stomach and coagulant systems. Phospholipases A₂ (PLA₂) enzymes, present in snakes and bees' venoms, and even in the human organism, are responsible for several physiological and pathological processes. These enzymes hydrolyze membrane phospholipids, releasing arachidonic acid, a precursor of pro-inflammatory eicosanoids, which give rise to inflammatory mediators.

Objective: The aim of the present work is to review new molecules able to block the cleavage of membrane phospholipids by the action of phospholipases A₂, preventing the formation of inflammatory mediators.

Methodology: A bibliographic revision from literature published from 2011 to 2021 focused on PLA₂ inhibitors was carried out. The potential of structure-activity relationship studies is discussed as a strategy to find active compounds against PLA₂.

Results: 26 studies including natural and synthetic compounds were reviewed and data from 93 molecules with inhibitory activity were collected, highlighting its potential as PLA₂ inhibitors.

Conclusion: The inhibitory activity of the reviewed compounds could be associated with the substitution patterns in the benzene ring of the molecules. The evaluation of molecular moieties with relevant capacity to inhibit PLA₂ will lead to the identification of candidates for synthesis of new enzymes inhibitors.

Keywords: Phospholipase A₂, inflammation, enzymatic activity, inhibition.

INTRODUCCION

El descubrimiento de nuevos prototipos con actividad inhibitoria de fosfolipasas A₂ (PLA₂) es un área de gran interés farmacológico y biotecnológico, orientado a evitar los efectos fisiopatológicos derivados de la acción de las PLA₂ a nivel orgánico o derivada de accidentes ofídicos. En este escenario resulta de gran importancia desarrollar investigaciones enfocadas al descubrimiento de moléculas con alta bioactividad, y especificidad, que disminuyan la actividad enzimática de las PLA₂. Una molécula bioactiva se convertirá en un modelo para desarrollo de un fármaco si además no presenta toxicidad y es efectiva en el tratamiento de enfermedades cuyo mecanismo de acción involucra a esta enzima (Sales et al., 2017).

Los venenos animales son mezclas de sustancias ricas en moléculas biológicamente activas como proteínas (con y sin actividad enzimática), péptidos, aminos biogénicas y otras, que poseen alta especificidad por una variedad de dianas específicas lo que afecta la fisiología orgánica y la homeostasis celular. (Harvey, 2014; Utkin, 2015). En

los venenos de serpientes, alrededor del 90% de sus componentes son de origen proteico (Tasoulis & Isbister, 2017), siendo las PLA₂ las enzimas más abundantes. Estas enzimas hidrolizan el enlace éster 2-acílico en los fosfolípidos de membrana liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres como, por ejemplo, ácidos araquidónico (ARA) u oleico (Calvete, 2013; Dennis et al., 2011; Filkin et al., 2020).

A continuación, se revisarán estudios los cuales han promovido la búsqueda de nuevas moléculas inhibitoras de PLA₂, algunos de estos estudios han tomado las PLA₂ presente en los venenos de serpientes y posteriormente han sido evaluadas frente a moléculas de origen natural y sintético como inhibitoras de la actividad enzimática. Revisaremos las moléculas y sus grupos funcionales para conocer aquellas con la estructura molecular más promisoría como potenciales inhibidores de la actividad enzimática.

Las enzimas fosfolipasas y fosfolipasas A₂: características y funciones

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas involucradas en la hidrólisis de fosfolípidos. Hay cinco tipos básicos de fosfolipasas, clasificadas según los sitios de escisión en sustratos de fosfolípidos.

Las fosfolipasas A (PLA) son acil hidrolasas clasificadas según la capacidad de hidrolizar al éster 1-acílico (PLA₁) o al 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). Por tanto, la PLC y la PLD son fosfodiesterasas (Xuemin, 2018).

La superfamilia de PLA₂ está conformada por 16 grupos de proteínas (I-XVI) con masa molecular (de 10 a 114 kDa), divididas en seis subgrupos distintos: PLA₂ secretadas (sPLA₂), PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ independientes de calcio (iPLA₂), acetilhidrolasas PAF (PAF-AH), lisosomal (LPPLA₂) y específica del tejido adiposo (AdPLA₂) (Dennis et al., 2011; Filkin et al., 2020; Quach et al., 2014). Las sPLA₂ se caracterizan por tener un bajo peso molecular (14-18 kDa), estas isoformas son calcio dependientes y actúan en la sección extracelular de la membrana celular (Batsika et al., 2021; Quach et al., 2014; Zhang et al., 2021).

Las sPLA₂ contienen de cinco a ocho enlaces disulfuro y se clasifican 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 sPLA₂ se incluye las PLA₂ de páncreas, líquido sinovial, venenos de serpientes y abejas (Dennis et al., 2011; Magrioti & Kokotos, 2013; Su & Chang, 1984). Estas enzimas se involucran en mecanismos de edema, hemorragia e inhibición de la agregación

plaquetaria, así también generan efectos neurotóxicos, anticoagulantes y miotóxicos (Da Silva et al., 2009; Xiao et al., 2017)

Las PLA₂ de veneno (sPLA₂) presentes en las serpientes están clasificadas en el Grupo I (IA/IB) y Grupo II (IIA/IIB). 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 varían respectivamente. 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) tienen 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).

PLA₂ y su relación con la inflamación

Las PLA₂ hidrolizan fosfolípidos de membrana liberando 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 ciclooxigenasas (COX1 / COX2) y en leucotrienos (LT) por acción de la 5-lipoxigenasa (5-LO). Este proceso se esquematiza en la *Figura 1*.

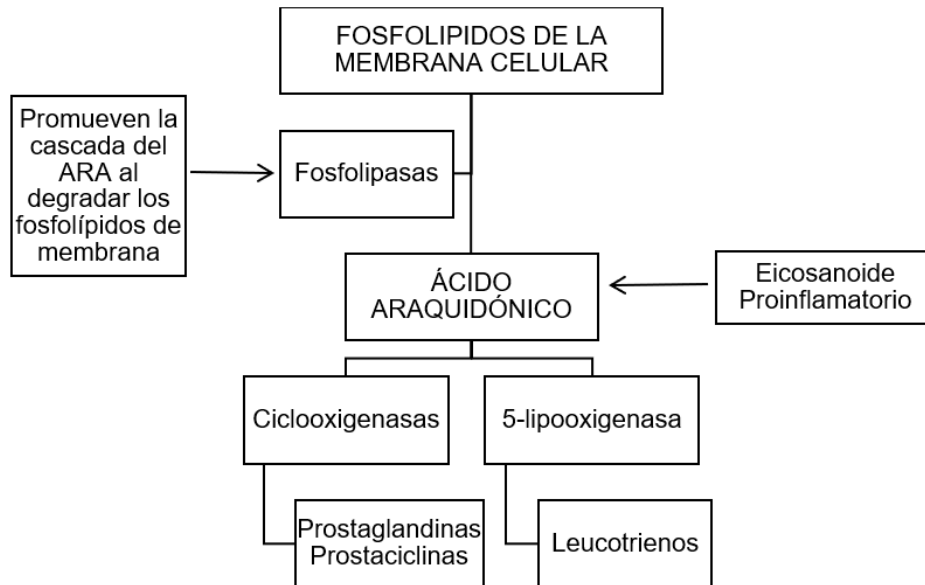


Figura 1. Cascada del ARA por acción de las COX y 5-LO con la formación de eicosanoides proinflamatorios

Los 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. Se estima 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).

Respecto a la regulación de la expresión de sPLA₂ por señalización celular y regulación génica, los productos de degradación de la escisión de los fosfolípidos (ARA y lisofosfolípidos=LP) por sPLA₂ y cPLA₂ pueden metabolizarse más a segundos mensajeros de señalización (Ácido lisofosfatídico=LPA, PG, LT) para desencadenar vías de señalización celular activando receptores acoplados a proteína G (GPCR) y receptores de citocinas. Estos eventos resultan en la amplificación de la producción de citocinas proinflamatorias y la intensificación de la inflamación. (Quach et al., 2014).

La desregulación de la actividad enzimática de las sPLA₂ 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, entre otros (Alasmay 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, entonces el ARA se metaboliza en las células a través de la COX y la 5-LO para producir mediadores proinflamatorios como PG y LT, respectivamente. Estos 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).

Moléculas naturales y sintéticas, candidatas a inhibidoras de sPLA₂

Encontrar nuevos prototipos terapéuticos mediante análisis *in vitro* se muestra como una alternativa para la síntesis y bioensayos *in vivo* racionales de nuevas moléculas. Se han estudiado compuestos con actividad inhibitoria frente a PLA₂ con estructuras moleculares de tipo flavonoide (Carvalho et al., 2013), incluyendo a cumarinas ya que el anillo benzopirano es una estructura común e intermedia en la síntesis de flavonoides y cumarinas, además están ampliamente ligadas al tratamiento de enfermedades inflamatorias, en donde, el farmacóforo ligado a la acción antiinflamatoria es el anillo benzopirano, el mismo que presenta actividad anti sPLA₂ mediante inactivación del canal hidrofóbico de la enzima mencionada. Se muestran estructuras generales de estos dos tipos de moléculas en la *Figura 2*.

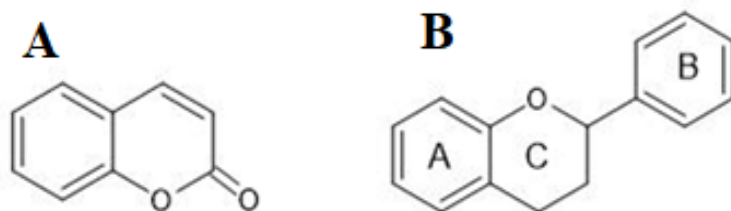


Figura 2. (A) Estructura general de las cumarinas, (B) Estructura general de los flavonoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad enzimática inhibitoria de sPLA₂

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 a 2021 y se revisaron un total de 26 estudios acerca de la inhibición de sPLA₂.

Como las PLA₂ (sPLA₂, cPLA₂ y 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 (Pedada et al., 2016).

Las moléculas con actividad inhibitoria frente a la enzima sPLA₂ fueron analizadas con la finalidad 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, y a partir de esta revisión se identificaron rasgos estructurales característicos, con el fin de guiar nuevos procesos de síntesis de moléculas promisorias ante este blanco farmacológico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Varios inhibidores de PLA₂ han sido estudiados en el período abordado en esta revisión de literatura, y algunos se han evaluado a nivel de ensayos clínicos para diversas enfermedades inflamatorias y oncológicas, los cuales se reportan en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Nuevos inhibidores de PLA₂ evaluados en ensayos clínicos

Inhibidores de PLA ₂	Enfermedad	Estudio N°/ Fase de estudio clínico	Fechas del estudio	Referencias
Varespladib	Tratamiento por mordedura de serpientes	NCT04996264	2021	(Carter et al., 2023)
Metil-varespladib		Fase 2		
Giripladib	Osteoartritis	NCT00396955	2006-2007	(Dennis et al., 2011)
	Artritis reumatoide	NCT00440492	2006-2007	(Batsika et al., 2021)
Darapladib	Síndrome agudo coronario	NCT01000727	2009-2014	(Stability Investigators, 2014)
		Fase 3		

Nuevas moléculas inhibidoras de fosfolipasa A₂

Los estudios revisados incluyen ensayos de compuestos naturales y sintéticos que demuestran la actividad inhibitoria frente a sPLA₂ de novedosas moléculas cuyas estructuras se presentan a continuación en la *Tabla 2*.

Tabla 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 epigallocatequina	(Pereañez et al., 2011)
	Morelloflavona	(Pereañez et al., 2014)
	Casuarictina	(Rodríguez 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)	
Terpenoides	Oleanil erucoato	(Umar et al., 2014)
	Ar-Turmerona, 4-nerolidilcatecol, 12-metoxi-Nb-metilvoachalotina, ácido betunílico	(Carvalho et al., 2013)
	Celastrol, ácido maslínico	(Nikolaou et al., 2019)
	SID 249494134	(Muthusamy et al., 2017)

	SID 249494135	
	A-santonina	(De Alvarenga et al., 2011)
Heterocíclicos	Wedelolactona	(Carvalho et al., 2013)
Fitosteroles	Citosterol, Stigmasterol	(Carvalho et al., 2013)
Amidas	Elaidoilamida	(Carvalho et al., 2013)
Glucósidos	Ikshusterol3-O-glucósido	(Muthusamy et al., 2018)
Organosulfurado	Sulforafano	(Nikolaou et al., 2019)
Ésteres de ácido graso	6-palmitato de ácido ascórbico	(Mohamed et al., 2011)
Bencenoides	Ácido vainillico	(Sales et al., 2017)
COMPUESTOS SINTÉTICOS		
Fenoles	2, 4-dihidroxibenzaldehído, 2- hidroxí-3-etoxibenzaldehído 2-hidroxí-4-aliloxibenzaldehído 2-hidroxí-4-butiloxibenzaldehído 2,3-dihidroxí-bencilalcohol, 2-hidroxí-3-metoxí-bencilalcohol	(Alam et al., 2016)
Terpenoides	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	(De Alvarenga et al., 2011)
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-3-il]-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 4-(3-Acetil-2-metil-imidazo[1,2- α]piridin-8-il)-N-ciclopentil-2-etil-butiramida	(Anilkumar et al., 2015)

	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	
	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	(Bukhari et al., 2014)
Ácido carboxílico	Ácido (S) -3-metil 2- (2-oxohexadecanamido) butanoico	(Vasilakaki et al., 2016)
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)
Bencenoides	Varespladib	(Kokotou et al., 2017)
	Metil-varespladib	(Nikolaou et al., 2019)

93 compuestos con actividad inhibitoria frente a sPLA₂ fueron clasificados según su origen: natural y sintético. Entre las moléculas de origen natural se encuentran compuestos fenólicos, terpenoides, heterocíclicos, fitosteroles, amidas, glucósidos, organosulfurados, ésteres de ácido graso y bencenoides. Las moléculas sintéticas incluyen compuestos fenólicos, terpenoides, heterocíclicos, amidas, ésteres y bencenoides.

La *Tabla 2* muestra una gran diversidad estructural de moléculas naturales y sintéticas, promisorias por su capacidad inhibitoria de la enzima sPLA₂. (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).

Existen datos de cumarinas inhibitoras de PLA₂ como en el estudio de Fonseca et al., 2010 en el cual se evidenció 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 reporta 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 inhibición de la actividad de esta enzima. Nargotra et al., 2011 realizaron estudios *in silico*, identificando 27 estructuras cumarínicas como posibles inhibidores de la sPLA₂ de *Vipera russelli*.

En el estudio de Carvalho et al., 2013, se demuestra 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. En el trabajo de Novo Belchor et al., 2017, se evaluó la Quercetina (Q) y sus derivados metilados ramentina (Rhm), ramnazina (Rhz) 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, Rhz exhibió mayor inhibición que 3MQ y Rhm. La actividad inhibitoria de Rhz fue similar a Q. A pesar de que Rhz 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, Rhz y Q, lo que lleva a la inhibición de sPLA₂. Sin embargo, Rhz 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. 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.

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 se muestra relevante en la actividad inhibitoria frente a la enzima sPLA₂.

El mecanismo inhibitorio 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.

Es importante destacar que, entre las moléculas bioactivas reportadas en nuestra revisión bibliográfica no se encuentran 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.

Un 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.

El conocimiento recopilado del análisis del mecanismo de acción y características estructurales de inhibidores de sPLA₂ permitirá plantear estudios de relaciones estructura – actividad, orientados a seleccionar moléculas candidato para el desarrollo de fármacos con mejor actividad y menos efectos secundarios, para el tratamiento del dolor y procesos inflamatorios.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se reportan compuestos de origen natural y sintético que interactúan con el sitio catalítico de la enzima sPLA₂ conformado por His/Asp. La revisión de literatura se encaminó a la búsqueda de compuestos que interactúen con estas enzimas en específico, ya que otras PLA₂ tienen sitios catalíticos diferentes y por tanto el mecanismo de acción puede variar. Así, los compuestos reportados han demostrado su afinidad por sPLA₂.

El análisis de las características estructurales de estos compuestos permite determinar que la actividad anti sPLA₂ puede asociarse a los patrones de sustitución en el anillo bencénico. Esto se desprende de la comparación de las moléculas reportadas en esta revisión. Adicionalmente se evidenció que los compuestos con sustituyentes nitrogenados podrían exhibir mayor actividad, ya que ejercen un efecto no inductivo, al ceder sus cargas pueden unirse con mayor facilidad al sitio activo de la enzima. No obstante, se recomiendan estudios a futuro con este tipo de moléculas 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.

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 venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, 75, 44-62.

Carter, R. W., Gerardo, C. J., Samuel, S. P., Kumar, S., Kotahal, S. D., Mukherjee, P. P., Shirazi, F. M., Akpunonu, P. D., Bammigatti, C., & Bhalla, A. (2023). The BRAVO clinical study protocol: Oral varespladib for inhibition of secretory phospholipase A2 in the treatment of snakebite envenoming. *toxins*, 15(1), 22.

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., Kaliampurthi, 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.

Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, *92*, 193-200.

Hui, D. Y. (2012). Phospholipase A2 enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*, *23*(3), 235.

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.

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 phytocompound 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.

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.

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.

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.

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.

Stability Investigators. (2014). Darapladib for Preventing Ischemic Events in Stable Coronary Heart Disease. *The New England Journal of Medicine*, 370(18), 1702-1711.

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.

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.

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.