

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**LA PIEL DE LOS ANFIBIOS COMO FUENTE DE  
PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE PÉPTIDOS  
TERAPÉUTICOS PARA LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

Lic. Roque Spinelli

Director de Tesis: Dr. Álvaro Sebastián Siano

Lugar de realización: Laboratorio de Péptidos Bioactivos –  
Departamento de Química Orgánica - Facultad de Bioquímica y  
Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral

**-2020-**

*“...y recuerda mirar hacia las estrellas y no a tus pies.*

*Trata de encontrarle sentido a lo que vez,  
y pregúntate qué hace que el universo exista.*

*Se curioso. Y por difícil que parezca la vida,  
siempre hay algo que puedes hacer y lograr;  
lo importante es no rendirse...”*

*Dr. Stephen Hawking*

*A Felipe y mi Abuela*

*Quienes siempre estarán en mis pasos.*

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue llevada a cabo en el Laboratorio de Péptidos Bioactivos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, bajo la dirección del Dr. Álvaro Siano.

Quiero agradecer a todos los que han colaborado en la realización de este trabajo de tesis:

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, así como a la Universidad Nacional del Litoral por brindarme el espacio y haber hecho posible la realización de esta Tesis, así como mis carreras de grado y posgrado.

Al CONICET y a la UNL, por haberme otorgado las becas de posgrado que me permitieron realizar el Doctorado.

A mi Director, el Dr. Álvaro Siano, por haberme guiado y transmitirme todos sus conocimientos científicos durante toda mi formación académica, tanto de grado como posgrado, teniendo total confianza en mí. Por motivarme y brindarme día a día, dándome la posibilidad de crecer a su lado. Su presencia en este camino fue fundamental, sin él esto no hubiera sido posible, muchas gracias.

Al Dr. Fernando Albericio y a las Dras. Eliandre de Olivera y Antonia Odena, por su invaluable colaboración y llevar a cabo los análisis por espectrometría de masas en su Institución.

A los jurados de la presente Tesis doctoral por el tiempo a invertir en la evaluación del presente manuscrito.

A la Universidad de Los Andes de Bogotá - Colombia, y al Instituto Pasteur de Montevideo - Uruguay, por haberme brindado la posibilidad de realizar instancias de investigación doctoral en sus instituciones.

Al Lic. Iván Sanchis, por su valiosa colaboración y aportes en la aplicación de las técnicas computacionales.

Al Dr. Javier Alejandro López, Dr. Andrés Attademo, y al Dr. Rafael Lajmanovich por brindar sus conocimientos y el material biológico para la realización de esta Tesis.

Al Dr. Ricardo Furlan quien actuó de evaluador externo del doctorado, no solo por sus comentarios y sugerencias, así como también por habernos brindado la posibilidad y conocimientos para llevar a cabo la técnica de TLC-bioautografía.

Al Colegio Santafesino de Biotecnólogos por haberme brindado la posibilidad de formar parte de su destacada institución, y expandir mis fronteras.

Agradecer al notable grupo de trabajo del Laboratorio de Péptidos Bioactivos, tanto por su calidad científico-académica, de ideas, conocimientos y opiniones; así como también por su calidad humana. Vero, Pablo, Iván, Nico, Tito, Meli, Luisina, Flor y Nati, a todos los que forman o formaron parte gracias de verdad.

Aparte, agradecer a Iván, Nico y Tito por la compañía diaria (diurna y nocturna), por los viajes, mates, charlas y compartir este camino.

A Tito por permitirme formarlo y brindarle mis conocimientos en este camino que eligió, además de serme de gran apoyo durante esta etapa.

A los que ofrecieron su tiempo y esfuerzo desinteresadamente leyendo el manuscrito, Vero, Tito y Antonela.

Al cuerpo docente del Departamento de Química Orgánica con quienes compartimos el ámbito de la docencia día a día.

Al Dr. Héctor Goicoechea con quien tuve la fortuna de cruzarme en la vida y me mostró un mundo de posibilidades dentro de la ciencia.

A mi Abuela, quien me dio la posibilidad de ser la persona quien soy, permitiéndome cumplir mis sueños y darme infinitas posibilidades. Por haber estado junto a mí desde mi primer día. Siempre estarás conmigo en todo lo que realice.

A Felipe, mi todo, las palabras son solo palabras y no bastan para expresar lo que representas en mi vida. Siempre junto a mí!

Agradecer infinitamente a mi familia. A mi mamá por brindarme su apoyo incondicional y por haberme dado todo; a mi hermana, a mis abuelos, mi tío y mi papá por su presencia.

A Todos los que estuvieron durante estos años y compartieron momentos conmigo en este camino de vida.

Muchas gracias!

- 2020. “Cytotoxic and antiproliferative activities of amphibian (anuran) skin extracts on human acute monocytic leukemia cells”. **Spinelli Roque**, Barrero Guevara Laura, López Javier Alejandro, Muñoz Carolina, Groot de Restrepo Helena, Siano Álvaro. *TOXICON*. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.01.008
- 2020. “Acetylcholinesterase inhibitory activity of a naturally occurring peptide isolated from *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) and its analogs”. Sanchís Ivan, **Spinelli Roque**, Aschemacher Nicolas, Húmpola, Ma. Verónica, Siano Álvaro. *AMINO ACIDS*. DOI: 10.1007/s00726-019-02815-1
- 2019. “Amphibian skin extracts as source of bioactive multi-target agents against different pathways of Alzheimer's disease”. **Spinelli Roque**; Aimaretti Florencia, López Javier Alejandro, Siano Álvaro. *NATURAL PRODUCT RESEARCH*. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591396
- 2019. “Natural multi-target inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidase enzymes with antioxidant potential from skin extracts of *Hypsiboas cordobae* and *Pseudis minuta* (Anura: Hylidae)”. **Spinelli Roque**; Sanchís Ivan; Aimaretti Florencia; Portella Madelon; Attademo Andres; Húmpola Ma. Verónica, Tonarelli Georgina; Siano Álvaro. *CHEMISTRY AND BIODIVERSITY*. DOI: 10.1002/cbdv.201800472
- 2016. “Acetylcholinesterase-inhibitor hydrolysates obtained from ‘in vitro’ enzymatic hydrolysis of mannoproteins extracted from different strains of yeasts”. Spontón Pablo.; **Spinelli Roque**; Drago Silvina; Tonarelli Georgina; Simonetta Arturo. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY*. DOI: 10.1111/ijfs.12940

# ÍNDICE

La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN .....	13
Los anfibios.....	13
Orígenes y distribución .....	13
Morfología del anuro.....	15
Los anfibios como fuentes de compuestos biológicamente activos.....	17
Actividad antimicrobiana .....	18
Actividad antiviral .....	20
Actividad antiproliferativa.....	23
Actividad inmunomodulatoria.....	23
Actividad analgésica.....	24
Actividad antidiabética .....	24
Actividad antioxidante.....	25
Actividad inhibitoria de enzimas .....	25
La Enfermedad de Alzheimer .....	25
Teoría Colinérgica.....	28
Enzimas colinesterasas .....	30
Inhibidores de colinesterasas .....	33
Monoamino Oxidasas.....	34
Las enzimas como blancos terapéuticos.....	35
Agentes antioxidantes y quelantes .....	36
OBJETIVOS .....	39
GENERALES .....	39



ESPECÍFICOS .....	39
I: INTRODUCCIÓN .....	42
I.1. Especies consideradas en el estudio .....	42
Orden anura, familia Hylidae .....	42
<i>Boana cordobae</i> (Barrio, 1965).....	42
<i>Pseudis minuta</i> (Günther, 1858).....	43
Orden Anura, familia Leptodactylidae.....	44
<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen, 1815).....	44
<i>Leptodactylus mystacinus</i> (Burmeister, 1861).....	45
<i>Leptodactylus chaquensis</i> (Cei, 1950).....	46
I.2. Obtención de las secreciones de las pieles de anfibios.....	47
I.3. Cinética enzimática .....	47
Cinética de la inhibición enzimática .....	51
Inhibición competitiva.....	52
Inhibición no competitiva.....	53
Inhibición acompetitiva .....	54
I.4. Técnicas cromatográficas .....	55
Cromatografía en capa delgada.....	55
Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) .....	56
I.5. Bioautografía .....	56
I.6. Espectrometría de masas .....	58
Espectrometría de Masas Aplicada al Análisis de Polipéptidos .....	58
Analizadores de Masas .....	59
I: OBJETIVOS.....	62
GENERALES .....	62
ESPECÍFICOS .....	62
I: MATERIALES Y MÉTODOS .....	64

I.1. Fuente del material biológico .....	64
Muestreo de los anfibios .....	64
Metodologías de obtención de los extractos .....	64
Extracción con solventes (ES).....	64
I.2. Análisis cromatográficos .....	65
Cromatografía en capa delgada (TLC).....	65
Cromatografía Líquida de Alta Performance en fase reversa (RP-HPLC) .....	65
I.3. Análisis mediante electroforesis en gel .....	66
Geles de Tricina SDS-PAGE .....	66
I.4. Cuantificación de proteínas y péptidos.....	66
Método del ácido bicinconínico (BCA) .....	66
I.5. Espectrometría de masas .....	67
Análisis por Maldi-Tof.....	67
I.6. Determinación de la actividad biológica .....	67
I.6.1. Actividad enzimática de las colinesterasas .....	67
Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).....	68
Actividad inhibitoria de la enzima butirilcolinesterasa (BChE).....	69
Bioautografía .....	69
Determinación de la cinética enzimática de las colinesterasas (AChE y BChE)	70
I.6.2. Actividad inhibitoria de la monoamino oxidasa B (MAO-B) .....	70
I.6.3. Actividad antioxidante .....	71
I.6.4. Actividad quelante del hierro.....	72
I.7. Evaluaciones toxicológicas.....	73
Evaluación de la actividad hemolítica.....	73
Citotoxicidad frente a células de mamíferos .....	73
Cultivo celular .....	73
Citotoxicidad frente a células CHO-K1 .....	74

I.8. Análisis de datos.....	74
I: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	76
I.1. Muestreo de los anfibios.....	76
I.2. Caracterización analítica.....	76
Determinación del contenido de proteínas.....	78
Análisis mediante cromatografía en capa delgada (TLC).....	78
Análisis cromatográfico mediante RP-HPLC.....	79
Espectrometría de masas MALDI-Tof de los extractos.....	81
Electroforesis en geles de tricina SDS-PAGE.....	88
I.3. Actividad de los extractos frente a las colinesterasas.....	89
Actividad enzimática de AChE y BChE.....	89
I.4. Selección de las especies de mayor interés.....	91
I.5. Actividad biológica de las especies seleccionadas.....	91
Bioautografía para AChE y BChE.....	91
Estudios de la actividad cinética de AChE y BChE frente a los extractos.....	93
Actividad inhibitoria de los extractos frente a la MAO-B.....	97
Actividad neuroprotectora de los extractos.....	99
Antioxidantes.....	99
Agentes quelantes.....	102
I.6. Evaluación de la toxicidad.....	104
II: INTRODUCCIÓN.....	108
II.1. Espectrometría de masas análisis de polipéptidos.....	108
Espectrometría de masas en Tándem (MS/MS).....	109
Proteómica y Secuenciamiento de novo.....	110
La Espectrometría de Masas para el mapeo y secuenciamiento de péptidos a partir de extractos crudos.....	111
II.2. Análisis computacional de las secuencias.....	112

Alineamiento de secuencias .....	112
Predicción de estructura espacial de péptidos .....	114
II: OBJETIVOS.....	118
GENERALES .....	118
ESPECÍFICOS .....	118
II: MATERIALES Y MÉTODOS .....	120
II.1. Purificación de los extractos mediante RP-HPLC semipreparativa.....	120
II.2. Actividad enzimática de los purificados frente a las colinesterasas.....	120
II.3. Cromatografía líquida acoplada a electroscay y espectrometría de masas en tándem (nanoHPLC-ESI-MS/MS).....	120
Estudios de novo de los resultados obtenidos por ESI-MS/MS.....	121
II.4. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias identificadas .....	121
Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos .....	122
Análisis comparativos como péptidos reportados.....	122
Predicción de la estructura secundaria de los péptidos identificados.....	122
Estudios evolutivos de los péptidos .....	123
II: RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	125
II.1. Purificación de los extractos mediante RP-HPLC semipreparativa.....	125
II.2. Actividad inhibitoria de los purificados frente a AChE y BChE.....	126
II.3. Secuenciamiento peptídico <i>de novo</i> de las fracciones purificadas.....	127
II.4. Análisis fisicoquímico de las secuencias seleccionadas .....	149
II.5. Análisis estructural de los péptidos.....	154
II.6. Análisis proteolítico de los péptidos .....	157
II.7. Análisis comparativo con secuencias reportadas .....	158
II.8. Estudio evolutivo de las secuencias .....	165
III: INTRODUCCIÓN.....	170
III.1. Síntesis química de péptidos.....	170

III.2. Estudios computacionales.....	173
III:  OBJETIVOS.....	177
GENERALES.....	177
ESPECÍFICOS.....	177
III:  MATERIALES Y MÉTODOS.....	179
III.1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).....	179
Etapas de la síntesis y reactivos utilizados.....	179
Desprotección y clivaje.....	181
Purificación de los péptidos sintéticos.....	182
Espectrometría de Masas (MALDI-Tof).....	182
III.2. Determinación de la actividad biológica de los análogos.....	182
Actividad enzimática de las colinesterasas.....	182
Determinación de la cinética enzimática de las colinesterasas.....	183
Determinación de la reversibilidad de la inhibición de las colinesterasas.....	183
Actividad inhibitoria de la Monoamino oxidasa B (MAO-B).....	184
Actividad antioxidante.....	184
Actividad quelante del hierro.....	184
Evaluación de la actividad hemolítica.....	184
III.3. Análisis de datos.....	185
III.4. Estudios computacionales.....	185
Estudios interacción mediante <i>docking</i> para las colinesterasas.....	185
Estudio de dinámica molecular.....	186
III:  RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	190
III.1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).....	190
III.2. Evaluación biológica de los análogos sintéticos.....	191
Capacidad hemolítica de los análogos.....	191
III.3. Actividad de los análogos frente a las vías de la EA.....	192

III.3.1. Capacidad neuroprotectora de los análogos.....	192
Actividad antioxidante.....	193
Actividad Quelante del ion Fe <sup>2+</sup> .....	195
III.3.2. Actividad inhibitoria frente a la MAO-B .....	196
III.3.3. Actividad biológica frente a la AChE y BChE .....	198
Cinética de inhibición de los análogos frente a la AChE y BChE.....	200
Ensayos de reversibilidad de los análogos frente a la AChE y BChE .....	207
Comparación de la actividad de los análogos con fármacos comerciales.....	208
Estudios computacionales de frente a las colinesterasas.....	211
Interacción BcI-4/AChE .....	211
Interacción BcI-5/BChE .....	216
III.4. Los análogos como agentes multimoduladores de las vías patológicas de la EA .....	220
CONCLUSIONES.....	224
Conclusiones del capítulo I.....	224
Conclusiones capítulo II .....	225
Conclusión capítulo III .....	225
MATERIAL ANEXO .....	228
REFERENCIAS .....	247

## ABREVIATURAS

Å; Armstrong	DMF; N,N-dimetilformamida
Abs; Absorbancia	DNFB; 2,4-dinitrofluorobenceno.
ACh; Acetilcolina	DPPH; radical libre 2,2-difenil-1-picrylhydrazilo
AChE; Acetilcolinesterasa	DTNB; 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
ACN; acetonitrilo	DVB; Divinilbenceno
AD; Alzheimer Disease	E; Enzima
ATCI; Yoduro de actilcolina	EA; Enfermedad de Alzheimer
Aβ; Péptido beta amiloide	EC50; Concentración efectiva 50
Bc; <i>Boana cordobae</i>	EDT; Etanoditiol
BCA; Acido bicinconínico	EDTA; Ácido etilendiaminotetraacético
BChE; Butirilcolinesterasa	ES; Complejo enzima-sustrato
BcI; Serie de péptidos de la primera fracción purificada de <i>B. cordobae</i>	ES; Extracción con Solventes
BcII; Serie de péptidos de la segunda fracción purificada de <i>B. cordobae</i>	ESI; Ionización por electrospray
BOC; t-butoxicarbonilo	FDA; <i>Food and Drug Administration</i>
BSA; Albúmina sérica bovina	Fmoc; 9-fluorenilmetoxycarbonilo
BTCl; Yoduro de S-butirilcolina	GRh; Glóbulos rojos humanos
CAS; Sitio activo catalítico	H; Valor de hodrofobicidad Gravy
Ch; Colina	HC50; Concentración hemolítica 50
ChEs; Colinesterasas	HLP; Predicción del tiempo de vida media (en inglés, <i>Half Life Prediction</i> )
Da; Dalton	HOBt; Hidroxibenzotriazol
DCM; Diclorometano	HPLC; Cromatografía líquida de alta performance
DIEA; Diisopropiletilamina	IC50; Concentración inhibitoria 50

Kd; Contante de disociación	ROS; Especies reactivas de oxígeno
Ki; constante de afinidad o inhibición	RP; Fase reversa
Lc; <i>Leptodactylus chaquensis</i>	s; segundos
Ll; <i>Leptodactylus latrans</i>	S; Sustrato
Lm; <i>Leptodactylus mystacinus</i>	SDS-PAGE; (en inglés, <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
MALDI; Desorción por láser asistida por matriz	SNC; Sistema nervioso central
MAO-A; Monoamino oxidasa A	SPPS; Síntesis de péptidos en fase sólida
MAO-B; Monoamino oxidasa B	SVL; Longitud hocico cloaca (en inglés, <i>snout-vent length</i> )
MAOs; Monoamino oxidasas	TBTU; O-(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio
MS; Espectrometría de masas	TcAChE; <i>Tetronarce californica</i> Acetilcolinesterasa
MS-MS; Espectrometría de masas en tándem	TFA; Acido trifluoracético
MTDL, Ligando dirigido a múltiples objetivos (en inglés, <i>Multitarget directed ligand</i> )	TIS; Triisopropilsilano
OMS; Organización Mundial de la Salud	TLC; Cromatografía en capa delgada (en inglés, <i>Thin layer chromatography</i> )
PAMs; Péptidos antimicrobianos	Tof; Tiempo de vuelo (en inglés, <i>Time of flight</i> )
PAS; Sitio aniónico periférico	tr; tiempo de retención
PM; peso molecular	TRAP; Trampa de iones lineal
Pm; <i>Pseudis minuta</i>	Tris; Hidroximetilaminometano
PmII; Serie de péptidos de la segunda fracción purificada de <i>P. minuta</i>	UV; Ultravioleta
Rf; Relación de frente	Vmax; Velocidad máxima
RMN; Resonancia Magnética Nuclear	



# RESUMEN

La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

## RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas representan desórdenes ligados a deficiencias o anormalidades cerebrales, caracterizadas principalmente por una pérdida de la memoria y capacidades mentales, a medida que las células nerviosas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. La Enfermedad de Alzheimer (EA) no solo es la enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia, con más de 10 millones de nuevos casos alrededor del mundo cada año, sino que también es la que más mortalidad produce anualmente. Por lo cual es considerada una prioridad en salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Si bien las causas de la iniciación de la EA no están del todo vislumbradas, se sabe que se caracteriza por un desequilibrio en diversas vías metabólicas. En base a esto, se ha demostrado que pacientes con EA poseen una sobreactivación de las enzimas acetil y butiril colinesterasas (AChE y BChE), encargadas de hidrolizar el neurotransmisor sináptico acetilcolina (ACh), conllevando a un déficit en la comunicación neuronal. Actualmente, los inhibidores de las colinesterasas representan el principal y más utilizado tratamiento para la EA, y el desarrollo de nuevos fármacos continúa enfocándose en estas enzimas. Este hecho es debido a que tanto la AChE como la BChE, además de su función colinérgica de hidrolizar a la ACh a través de su sitio catalítico (CAS), también poseen una función no colinérgica, a través de su sitio aniónico periférico (PAS), que juega un rol crucial en la formación de las placas  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ). Las placas  $A\beta$  producen agregados interneuronales denominados placas seniles, que intensifican el daño cerebral en la EA.

Por otro lado, se demostró que los agregados de  $A\beta$  exacerbaban la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), deviniendo en un elevado estrés oxidativo y produciendo muerte neuronal. En adición a esto, recientemente se ha evidenciado que pacientes con EA presentan, además, un desequilibrio positivo de iones biometálicos (hierro, cobre y zinc), los cuales poseen capacidad redox activa. La disrupción de este equilibrio redox resulta en un potenciado estrés oxidativo, elevando las ROS y generando severos daños fisiológicos adicionales. Es por esto que la utilización tanto de agentes antioxidantes como quelantes que reduzcan los efectos tóxicos de las ROS son utilizados como neuroprotectores en el tratamiento de la EA.

---

Otra enzima que en los últimos años ha recibido gran atención debido a su rol en la EA es la monoamino oxidasa B (MAO-B). La MAO-B es encargada de desaminar neurotransmisores específicos, produciendo como subproductos radicales libres. En pacientes con EA la actividad de MAO-B se encuentra incrementada, lo que conduce a grandes cantidades de peróxido de hidrógeno, que en última instancia dan lugar al daño neuronal. Por lo tanto, los inhibidores selectivos de MAO-B son útiles en el tratamiento de este tipo de trastornos neurodegenerativos.

La EA es una compleja enfermedad neurodegenerativa multifactorial que se encuentra asociada a diferentes rutas patológicas. Por lo tanto, hoy en día las investigaciones anti-EA se enfocan en la búsqueda de compuestos multiobjetivo o MTDLs, que generen una modulación simultánea de las vías involucradas.

Por otro lado, estudios actuales han demostrado que los agentes terapéuticos de origen natural continúan situándose como los líderes para la generación de nuevas drogas. La piel de los anfibios anuros (ranas y sapos) constituye una enorme fuente de compuestos con un amplio rango de propiedades biológicas, entre los cuales se encuentran los péptidos. Estos, forman parte de su sistema de defensa, siendo sintetizados y almacenados en estructuras especializadas de su piel denominada glándulas granulares o “*glándulas venenosas*”. En respuesta al estrés o al ataque de depredadores los anfibios secretan al medio este complejo *cocktail* químico como mecanismo de defensa. Los péptidos no solo representan las moléculas más abundantes de las secreciones de anfibios, sino que también son las de mayor actividad biológica. El aislamiento de estos péptidos bioactivos ha llevado al desarrollo de agentes terapéuticos, con aplicaciones como antimicrobianos y antivirales, antiinflamatorios, agentes antitumorales, liberadores de insulina, y también como inhibidores enzimáticos. Por lo cual, el estudio de las pieles de los anfibios ha adquirido gran importancia en salud humana, representando una fuente atractiva y novedosa de compuestos naturales con un elevado potencial en el desarrollo de nuevas drogas.

Los péptidos se han posicionado como pioneros tanto en la medicina como en la biotecnología, llevando a las investigaciones en péptidos terapéuticos a ser uno de los campos de mayor crecimiento de las ciencias médicas actuales. La síntesis de péptidos en fase sólida, por su parte, es una versátil metodología que permite la generación de análogos peptídicos naturales de un modo muy eficiente.

El objetivo de esta tesis se centró en evaluar la potencialidad de las pieles de los anfibios anuros como fuentes de péptidos multimoduladores de las vías patológicas de la EA.

Las siguientes especies de anfibios anuros pertenecientes a las familias Hylidae y Leptodactylidae fueron estudiadas: *Boana cordobae*, *Pseudis minuta*, *Leptodactylus latrans*, *L. mystacinus*, y *L. chaquensis*. Los extractos fueron obtenidos mediante la metodología de extracción con solvente.

La profunda caracterización analítica de los extractos evidenció que estos son de una amplia complejidad, estando constituidos tanto por péptidos como por proteínas, mientras que en algunos casos por alcaloides.

Las especies que resultaron de mayor interés por sus propiedades biológicas fueron *B. cordobae* y *P. minuta*. Estas presentaron la capacidad de inhibir a ambas enzimas colinesterasas (AChE y BChE). Los análisis de las cinéticas de inhibición permitieron concluir que *B. cordobae* poseen una inhibición de tipo no competitiva; mientras que *P. minuta* una inhibición de tipo competitiva, frente a las colinesterasas. Mediante TLC-bioautografía, se evidenció que los responsables de la inhibición de las colinesterasas, en ambos extractos, son fundamentalmente compuestos de naturaleza peptídica y/o proteica. Además, ambos extractos mostraron ser activos contra otros blancos terapéuticos fundamentales en las terapias frente a la EA, al inhibir la enzima MAO-B, poseer actividad antioxidante y ser capaz de quelar biometales como el hierro.

Los extractos de *B. cordobae* y *P. minuta* fueron purificados por HPLC en fase reversa semipreparativa, y aquellas fracciones que conservaron su actividad inhibitoria frente a las colinesterasas fueron posteriormente secuenciadas *de novo* a través de espectrometría de masa en tándem (ESI-MS/MS). Esto permitió la identificación de diecinueve secuencias peptídicas inéditas, de las cuales dieciocho fueron de *B. cordobae* (quince en la fracción I y tres en la fracción II), y una de *P. minuta*.

Los estudios de caracterización fisicoquímica *in silico* para las secuencias identificadas permitieron comprobar que estas son de tipo carboxiamida y, además, ser de una longitud de cadena relativamente corta, estar cargadas tanto positiva como negativamente, y poseer hidrofobicidad media-baja. Por otro lado, las herramientas computacionales predijeron que los péptidos poseen regiones tanto de hélices  $\alpha$  como de *Coil*, no observándose conformaciones  $\beta$  o de lámina plegada.

Las diecinueve secuencias fueron sintetizadas mediante química en fase sólida Fmoc, para su evaluación biológica.

Los análogos sintéticos pertenecientes a la especie *B. cordobae* resultaron ser los más activos frente a las colinesterasas, superando en algunos casos la actividad de los fármacos comerciales. Entre ellos, el péptido BcI-4 exhibió una elevada capacidad inhibitoria para la AChE ( $IC_{50} = 0,90 \mu M$ ), actuando de forma reversible no competitiva, mediante la interacción con los residuos del sitio PAS. En cuanto a la BChE, los análogos de mayor actividad inhibitoria fueron BcI-5 ( $IC_{50} = 0,82 \mu M$ ), BcI-13 ( $IC_{50} = 14,42 \mu M$ ) y BcI-14 ( $IC_{50} = 2,12 \mu M$ ), resultando todos ser inhibidores de tipo reversible no competitivos.

Además, la actividad de MAO-B se vio inhibida por los análogos BcI-4 ( $IC_{50} = 150,64 \mu M$ ), BcI-13 ( $IC_{50} = 194,82 \mu M$ ), y BcI-14 ( $IC_{50} = 200,54 \mu M$ ). Estos estudios, permitieron evidenciar la capacidad de los análogos de modular tanto a las enzimas colinesterasas como a las monoamino oxidasas, claves en la EA.

Por otro lado, se evidenció el potencial de los péptidos de actuar como agentes neuroprotectores, presentando actividad antioxidante y quelante del hierro. Los análogos BcI-15 y BcI-4 demostraron ser notablemente agentes antioxidantes con valores de  $EC_{50}$  de 7,24 y 82,42  $\mu M$ , respectivamente. Además, el análogo BcI-4 fue capaz de quelar al  $Fe^{2+}$  ( $EC_{50} = 785 \mu M$ ).

Notablemente, Los estudios de toxicidad evidenciaron que los análogos más activos no resultaron hemolíticos a concentraciones de bioactividad.

El conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral evidencia por primera vez el potencial de las pieles de anfibios anuros como fuente de péptidos naturales con elevada capacidad como agentes multimoduladores de las vías involucradas en la Enfermedad de Alzheimer. Lográndose aislar y caracterizar ocho secuencias peptídicas novedosas de gran potencialidad como candidatos a nuevo líderes farmacológicos. Por otra parte, plantea como perspectiva futura la generación de modificaciones moleculares, así como la generación de péptidos híbridos capaces de potenciar las capacidades biológicas aquí halladas.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are a heterogeneous group of disorders that are characterized by the progressive degeneration of the structure and function of the central nervous system. Alzheimer's disease (AD) is the most common and deadly cause of dementia. Every year, ten million new cases are diagnosed worldwide, with unprecedented growth. Owing to this, the World Health Organization (WHO) considers it a priority in public health.

Although the causes of the initiation of AD are not fully understood, it is known that the disease is characterized by an imbalance in several metabolic pathways. In this sense, AD patients present an overactivation in acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes, which are involved in the hydrolysis of neurotransmitter acetylcholine (ACh), resulting in memory impairments. Nowadays, cholinesterases inhibitors are the only symptomatic treatment indicated for AD, and the efforts in the development of new drugs continue focusing on these. It is well documented that AChE possesses two binding sites involved in AD, the catalytic active site (CAS) responsible for ACh neurotransmitter hydrolysis, and the peripheral anionic site (PAS) located on the surface of the enzyme, responsible of noncholinergic functions of AChE, playing an essential role in the formation of the  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) deposits. The deposits of  $A\beta$  plaques increase the cerebral damage in AD.

Also,  $A\beta$  aggregates lead to the production of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress and eventually cell death. In addition, AD patients present a positive imbalance of ionic biometals (iron, copper and zinc). This biometals have an active redox capability and their imbalance increases the oxidative stress and physiological damages. Thus, the use of both antioxidant and chelating agents that reduce the toxic effects of ROS are useful as neuroprotectives in AD.

In addition, another enzyme has also received increasing attention in recent years due to its role in the treatment of AD, the monoamine oxidase B (MAO-B). The MAO-B is involved in the oxidative deamination of neurotransmitters, increasing the production of free radicals thus causing oxidative stress. MAO-B increases with age and its activity is found exacerbated in AD patients, leading to the production of large amounts of

hydrogen peroxide, which ultimately gives rise to neuronal damage. Therefore, MAO-B inhibitors are useful in the treatment of neurodegenerative disorders, such as AD.

AD is a complex multifactorial neurodegenerative disease associated with several pathological pathways. Nowadays, the pursuit of effective anti-Alzheimer treatments is focusing on molecules that make a simultaneous modulation of the different pathways associated with this complex disease.

On the other hand, current studies have shown that the therapeutic agents of natural origin continue to be the leaders for the generation of new drugs. The skins of anurans (frogs and toads) have proven to be a considerable source of compounds with a wide range of biological activity, among which are peptides, that not only are the major constituents, but also the most reported about their biological activity.

The frog host defense peptides are synthesized and stored in designated macroglands (called granular glands or poison gland) and are rapidly released in response to stress, or predators attack, acting like a defense weapon. These peptides have shown a wide range of biological effects in mammals, acting as antimicrobial (antibacterial, antifungal, antiprotozoal and antiviral), antitumoral, immunomodulators, antidiabetics and most recently even as enzymatic inhibitors. The study of the amphibians' skin has acquired great importance in the biology and human health field and represents an attractive and novel source of natural compounds with high potential in the development of new drugs.

Peptides have been established as pioneering molecules in both medicine and biotechnology, being one of the fastest growing fields in medical science nowadays. On the other hand, solid-phase peptide synthesis is a versatile methodology that allows the generation of natural peptide analogs in a very efficient way.

The aim of this thesis is focused on evaluating the potential of the anuran amphibians' skin as sources of multitarget peptides involved in the pathological pathways of AD.

The following species of anuran amphibians belonging to the Hylidae and Leptodactylidae families were studied: *Boana cordobae*, *Pseudis minuta*, *Leptodactylus*

---

*latrans*, *L. mystacinus*, and *L. chaquensis*. The extracts were obtained by the solvent extraction methodology.

The in-depth analytical characterization of the extracts proved their wide complexity, being constituted by both peptides and proteins, while in some cases alkaloids.

*B. cordobae* and *P. minuta* species were the most active extracts. These showed the capability to inhibit both cholinesterase enzymes (AChE and BChE). The kinetics inhibition analysis allowed to conclude that *B. cordobae* extract acts as a non-competitive inhibitor; while *P. minuta* showed a competitive inhibition against both cholinesterases. The TLC-bioautography assay demonstrated, in both extracts, that the compounds responsible for the inhibition of cholinesterases, are mainly peptides and /or proteins. In addition, both extracts were shown to be active against other fundamental therapeutic targets in AD therapies, by inhibiting the MAO-B enzyme, possessing antioxidant activity, and being capable of chelating biometals such as iron.

The extracts of *B. cordobae* and *P. minuta* were purified by semi-preparative reverse-phase HPLC. The fractions that were active against cholinesterases were subsequently *de novo* sequenced through tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). This analysis allowed the identification of nineteen unpublished peptide sequences, of which eighteen were from *B. cordobae* (fifteen in fraction I and three in fraction II), and one from *P. minuta*.

The *in silico* physicochemical characterization studies for the sequences, made it possible to know that they are of the carboxamide type. Furthermore, they are of a relatively short chain length, both positively and negatively charged and with medium-low hydrophobicity. On the other hand, predictive computational tools showed that the peptides have both  $\alpha$ -helix and *Coil* regions, with no  $\beta$  sheet conformations.

The nineteen sequences were synthesized by Fmoc solid phase synthesis for their further biological evaluation.

The synthetic analogs from the *B. cordobae* species were the most active against cholinesterases. Interestingly, in some cases these analogs displayed more activity than commercial drugs. Among them, the BcI-4 peptide showed a high inhibitory capacity for



---

AChE ( $IC_{50} = 0,90 \mu M$ ), acting as a reversible non-competitive inhibitor, by interacting with the PAS site residues. Regarding BChE, the analogs with the highest inhibitory activity were BcI-5 ( $IC_{50} = 0,82 \mu M$ ), BcI-13 ( $IC_{50} = 14,42 \mu M$ ) and BcI-14 ( $IC_{50} = 2,12 \mu M$ ), all of which were of reversible not competitive inhibition.

In addition, MAO-B activity was inhibited by the analogs BcI-4 ( $IC_{50} = 150,64 \mu M$ ), BcI-13 ( $IC_{50} = 194,82 \mu M$ ), and BcI-14 ( $IC_{50} = 200,54 \mu M$ ). These studies made it possible to demonstrate the ability of analogs to modulate both cholinesterase enzymes and monoamine oxidases, which are key enzymes in AD.

On the other hand, the potential of peptides to act as neuroprotective agents was evidenced, by their potential as antioxidants and iron chelators. In this regard, the analogs BcI-15 and BcI-4 proved to be remarkably antioxidant agents with  $EC_{50}$  values of 7,24 and 82,42  $\mu M$ , respectively. And, the BcI-4 analog was able to chelate  $Fe^{2+}$  ( $EC_{50} = 785 \mu M$ ).

Notably, the toxicity studies showed that the most active analogs were not hemolytic at bioactive concentrations.

The present doctoral thesis showed for the first time the potential of anuran amphibian skins as a source of natural peptides with high capacity as multitarget agents of the pathways involved in Alzheimer's disease. Here we isolated and characterized eight novel peptide sequences of great potential as candidates for new pharmacological leaders. On the other hand, we propose the generation of molecular modifications, as well as the generation of hybrid peptides capable of enhancing the biological capacities, as a future perspective.

# INTRODUCCIÓN

La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

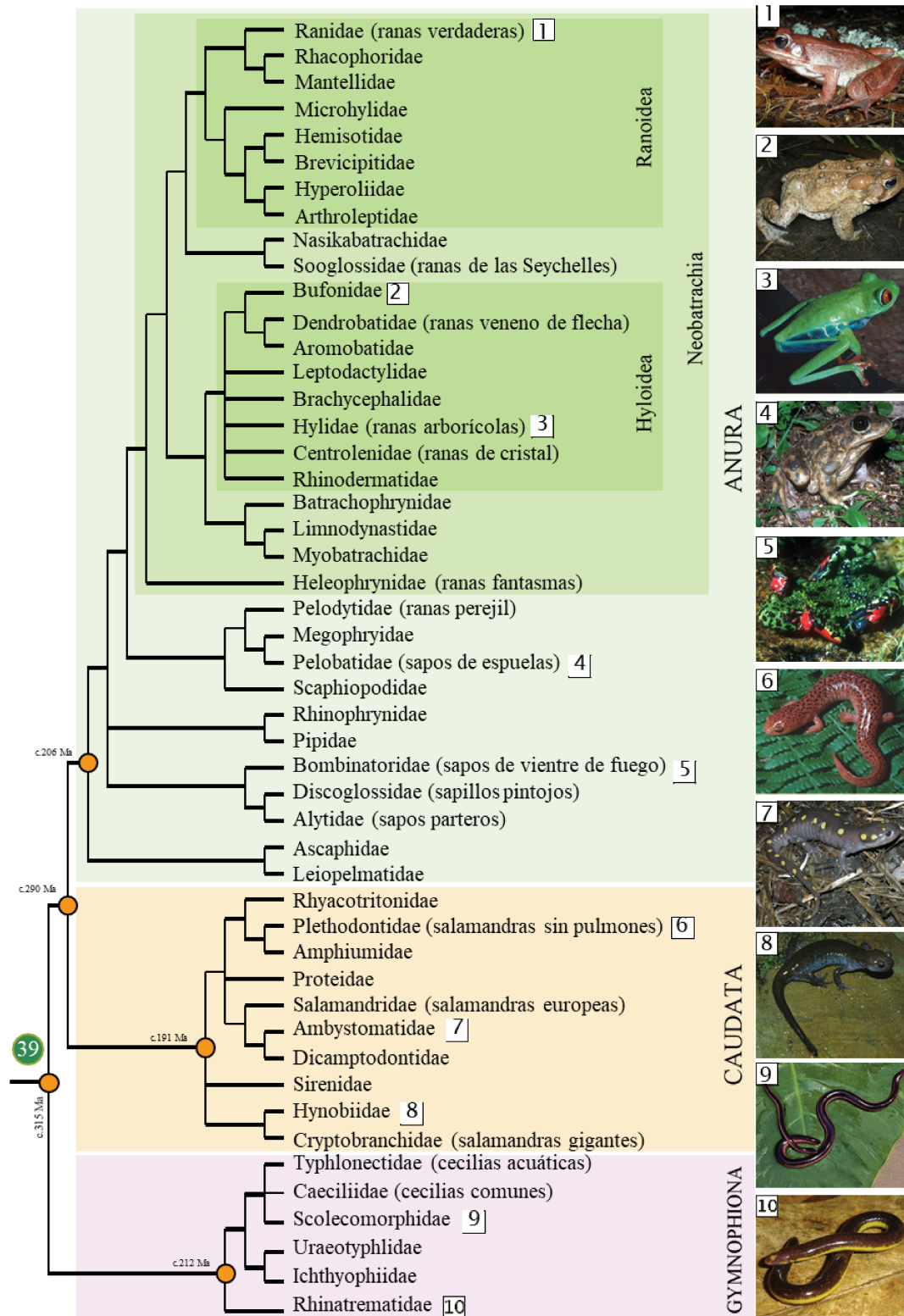
# INTRODUCCIÓN

## Los anfibios

### Orígenes y distribución

Los anfibios (del griego, amphí ('ambos') y bíos ('vida'), que significa “ambas vidas” o “en ambos medios”), pertenecen al grupo de vertebrados anamniotas (sin amnios), tetrápodos, ectotérmicos, con respiración branquial durante la fase larvaria, y pulmonar al alcanzar el estado adulto. A diferencia del resto de los vertebrados, se distinguen por sufrir una transformación durante su desarrollo. Este cambio se denomina metamorfosis [1]. Los anfibios modernos tienen una larga historia evolutiva, que se extiende al menos hasta el período pérmico, o incluso el devónico tardío, tras emerger de los océanos para adaptarse a una vida terrestre. El cambio de un ambiente acuático a uno terrestre se fue dando a través de la adquisición gradual de una serie de adaptaciones, tanto morfofuncionales como de comportamiento, permitiéndoles así pasar prolongados periodos en un ambiente terrestre [2]. Estos fueron los primeros vertebrados en adaptarse a una vida semiterrestre, presentando en la actualidad una distribución cosmopolita, con ejemplares en prácticamente todo el mundo [3]. Hoy en día hay más de 7490 especies de anfibios descritas [4].

Los anfibios pertenecen a la clase Amphibia, en la cual podemos encontrar tres órdenes con formas y biología marcadamente diferentes (Figura 1): los Caudados o Urodelos, anfibios con cola (salamandras y tritones); los Anuros, anfibios sin cola (ranas y sapos); y los Gimnofiones, también conocidos como cecilias [2].



Las ramas con líneas gruesas (—) indican clados robustos y las ramas con líneas finas (—) clados poco robustos. El número en círculo verde indica el capítulo donde se une la rama. Los círculos naranjas marcan los principales nodos y las edades de los mismos. Las fotografías representan grandes linajes (números en recuadros).

**FIGURA 1.** Árbol filogenético de los anfibios. Se muestran las relaciones filogenéticas de las familias taxonómicas (Figura modificada de San Mauro, 2012).

Actualmente, los anuros son el grupo más numeroso de anfibios; se estima que existen más de 6608 especies, repartidas en 54 familias distribuidas en todos los continentes excepto la Antártida (Figura 2) [5]. Tanto el registro fósil como las estimaciones basadas en datos moleculares indican que el linaje ancestral de los anuros ya estaba presente en la Pangea, tanto en las regiones meridionales como en las septentrionales, antes de su fragmentación durante el jurásico. La mayoría de los anuros pasan su vida dentro o cerca del agua, aunque se han encontrado especies adaptadas a zonas más áridas [6]. Su tamaño puede variar desde un par de milímetros, hasta tallas que superan los 30 centímetros [6]. Este clado, más allá de carecer de cola, presenta un cuerpo corto y muy ensanchado, con patas posteriores más desarrolladas y adaptadas para el salto.



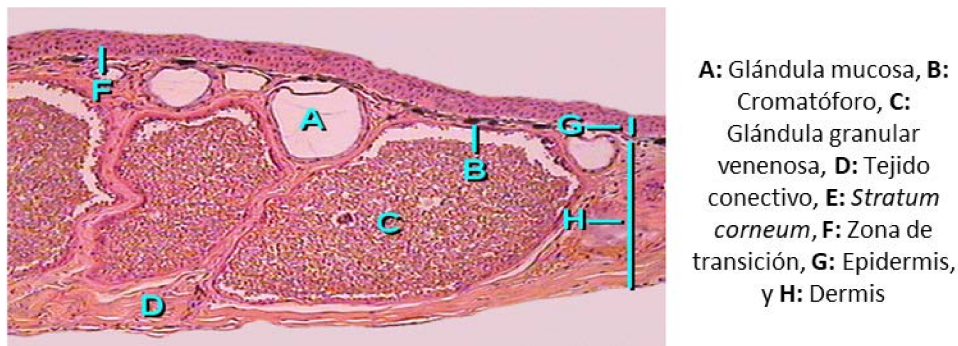
FIGURA 2. Distribución global del Orden Anura.

### Morfología del anuro

En un principio, los términos “rana” y “sapo” hacían referencia a los dos tipos de anfibios anuros que aparecieron en la Península Ibérica, las ranas típicas, género *Rana*; y los sapos típicos, género *Bufo*, pero en la actualidad se utilizan de forma indiscriminada y arbitraria. El término *Rana* suele referirse a las especies más gráciles, de piel húmeda y lisa, buenas saltadoras, y de hábitos trepadores y/o acuáticos. Mientras que *Sapo* hace referencia a las especies de piel más seca y rugosa, más robustas, menos ágiles y

marchadoras, que suelen habitar en el suelo húmedo excavando galerías. Por tanto, esta distinción entre ranas y sapos no denota una discriminación de tipo taxonómica [7].

Las ranas y sapos poseen la piel desnuda; es decir, no está protegida ni por pelos o plumas como en el caso de los mamíferos o aves, y tampoco poseen escamas, como los reptiles o los peces, que los protejan de la desecación, rayos UV del sol, agresiones del medio externo o del ataque de depredadores. Sin embargo, la piel de los anfibios es poseedora de una enorme cantidad de glándulas cutáneas que les permiten hacer frente a estas dificultades [8]. A su vez, la permeabilidad de su piel favorece el intercambio de gases, ya que estos poseen tanto respiración pulmonar como cutánea, y les proporciona absorción de agua, por lo que la mayoría no suelen necesitar beberla [8].



**FIGURA 3.** Sección de la piel de una rana. (Figura modificada de <http://allyouneedisbiology.wordpress.com>).

Dos capas constituyen su piel, una externa, epidermis, y una interna, dermis (Figura 3). La epidermis está formada por varias capas de células, mientras que la dermis posee una estructura esponjosa [8]. La capa más externa que forma la epidermis está sujeta a renovaciones; esta capa contiene depósitos de queratina, y su mayor o menor proporción depende del hábitat del anuro. La queratina es una proteína fibrosa y muy resistente que proporciona a los anfibios protección contra el desgaste y evita la pérdida de agua [8]. La zona de transición entre la epidermis y la dermis de los anfibios presenta células pigmentadas que le otorgan a la piel diferentes variedades de coloraciones. Estas células se denominan cromatóforos [9]. En la dermis se encuentran dos tipos de glándulas: las glándulas mucosas y las glándulas granulares. Las primeras están distribuidas a través de toda la piel del anfibio y sus secreciones proporcionan un recubrimiento húmedo necesario para la respiración cutánea, además de controlar el pH, mantener húmeda la piel y la termorregulación, mediante la producción de moco [10]. Las glándulas granulares o también denominadas “glándulas venenosas” (ver Figura 3), a menudo se

agregan para formar estructuras prominentes (macroglándulas), y se distribuyen por todo el cuerpo, pero principalmente se concentran alrededor de la cabeza o el cuello. Estas sirven para proteger al anfibio de potenciales depredadores y microorganismos mediante la liberación de secreciones [11].

Las glándulas granulares están formadas por tres partes: el ducto, la región intercalar y la glándula alveolar. El ducto se encuentra constituido por queratinocitos que atraviesan la epidermis, lo que permite que las secreciones sean eliminadas hacia la superficie del cuerpo. La región intercalar es la zona intermedia entre el ducto y las glándulas alveolares y se encuentra justo por debajo de la epidermis [12]. Las glándulas alveolares están ubicadas en el estrato esponjoso, y contienen el epitelio secretor asociado directamente a terminales nerviosas [13]. Este tipo de glándulas son las encargadas de la protección del animal, mediante acción del sistema inmune y la secreción de diferentes compuestos, como ser péptidos antimicrobianos, aminas, aminas biógenas, entre otros [14].

### Los anfibios como fuentes de compuestos biológicamente activos

A lo largo de la historia, los anfibios y el hombre han tenido una larga relación, ya sea como un recurso alimenticio, como controladores naturales de plagas, y principalmente representando una fuente medicinal de amplio espectro.

El uso curativo de los anfibios se remonta a las culturas más antiguas, principalmente en China, donde se utilizaban en forma de “brebajes o pociones” debido a sus propiedades medicinales como agentes antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, antitumorales y alucinógenos, entre otros [7; 15]. Representando este folklore curativo de los productos naturales los peldaños de las ciencias médicas modernas [16].

La importancia del estudio de los anfibios como fuente medicinal radica en su función como predadores y presas. Los anfibios son criaturas casi indefensas, que resultan presas de una gran variedad de depredadores. Por lo cual, para protegerse han desarrollado diferentes características morfológicas, fisiológicas y de comportamiento [7].

En respuesta a la contaminación ambiental, al estrés o al ataque de depredadores, los anfibios son capaces de secretar un complejo cóctel químico a través de estructuras especializadas de la piel, las glándulas granulares. Se ha demostrado que estas secreciones contienen gran cantidad de componentes químicos con actividad biológica, entre los

cuales se incluyen péptidos y proteínas, alcaloides, aminas biógenas, entre otros. Su aislamiento, identificación y caracterización ha llevado al desarrollo de agentes bioactivos tanto para uso humano como veterinario. El espectro de actividad biológica de estos compuestos es muy amplio, entre los cuales se destacan, compuestos antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, antitumorales, inhibidores enzimáticos, agentes espermicidas, etc. [7; 17].

Los anfibios poseen un sistema inmunitario altamente evolucionado. Su piel está protegida tanto por el sistema inmune innato como por las defensas adaptativas, aunque estas últimas se desarrollaron de forma más lenta en vertebrados de sangre fría. El sistema inmune innato de estos organismos está constituido por macrófagos, neutrófilos, proteínas del complemento, células *natural killer* y péptidos antimicrobianos (PAMs). Los PAMs son sintetizados y almacenados en las glándulas granulares de la capa dérmica de la piel, y ante señal de alarma o injuria son liberados a la superficie [14]. Las glándulas granulares contienen además un amplio rango de compuestos como ser aminas, proteínas, esteroides y alcaloides [18]. Estos últimos, están presentes debido a que las ranas son capaces de secuestrar en su piel alcaloides que obtienen de sus presas. Esta estrategia no solo evita el gasto de energía necesario para producir tales compuestos, sino que además las proveen de protección contra un amplio rango de posibles enemigos [19].

Más de 39 años de investigación hasta la fecha, demuestran que los productos naturales y sus correspondientes derivados miméticos, continúan siendo la fuente principal en el descubrimiento de nuevas drogas [16]. El estudio de la piel de los anfibios ha adquirido gran importancia en el campo de la salud humana, debido a que constituye una fuente atractiva y prometedora de compuestos naturales, con un elevado potencial para el desarrollo de nuevos fármacos [20]. Los péptidos representan, no solo las moléculas más abundantes de las secreciones de las pieles de anfibios, sino que además resultan ser las más estudiadas y de mayor potencial bioactivo [17]. A continuación, se enumeran algunas de las propiedades bioactivas más representativas de las pieles de anfibios, y principalmente de los péptidos aislados de ella (Tabla 1).

### Actividad antimicrobiana

La piel de los anfibios ha sido ampliamente explorada debido al gran número de PAMs presentes en las secreciones de las glándulas granulares, los cuales han demostrado ser efectivos frente a infecciones bacterianas y fúngicas [21].



El primer grupo de PAMs caracterizados fueron las *Oceletinas*, aisladas a partir de la especie *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae), las cuales presentan actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, pero también exhiben una elevada actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos [22]. Además, a partir de *L. latrans* se lograron aislar e identificar los péptidos LI-1577, LI-1298 y LI-2085, capaces de inhibir el desarrollo de cepas de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* [23].

Por otro lado, las *Magaininas*, son una familia de péptidos constituidos por un promedio de 23 residuos, con estructura secundaria de alfa hélice, aislados de la piel del sapo africano *Xenopus laevis* (Anura: Bufonidae). Esta familia de péptidos presenta una actividad antibiótica de amplio espectro, inhibiendo el desarrollo tanto de bacterias Gram positivas como Gram (-), y especies fúngicas como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae*, y siendo de baja actividad hemolítica [24]. Otro péptido aislado de *X. laevis*, es el *PGLa*, quien también demuestra elevada actividad antimicrobiana [25].

Especies del género *Phyllomedusa*, perteneciente a la familia Hylidae, principalmente *Phyllomedusa bicolor* y *Phyllomedusa sauvagii* poseen péptidos antimicrobianos conocidos como *Dermaseptinas* [26]. Estos péptidos, cargados positivamente, ricos en lisina, de entre 28 y 34 residuos; poseen la capacidad de permeabilizar las membranas de bacterias Gram (+) y (-), levaduras y hongos filamentosos, con baja actividad hemolítica. Dentro de las *Dermaseptinas*, las de mayor actividad son la *dermaseptina I*, *dermaseptina b* y *dermatoxina* [27-28].

La serie de péptidos *Hp-1971*, *Hp-1935* y *Hp-1891*, aislados a partir de *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) resultaran activos frente a las bacterias *E. coli* y *S. aureus* [29].

Las *Bombininas*, péptidos aislados de las especies del género *Bombina*, también son poseedores de un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias Gram (+) y Gram (-) [30].

Por otro lado, se encuentran las *Temporinas*, que es una de las familias de PAMs reportadas más amplias. Los péptidos de esta familia son de naturaleza anfipática con estructura secundaria de alfa hélice, con un largo de cadena de entre 8 y 17 residuos, aislados de la *Rana temporaria* (Anura: Ranidae) [31]. Miembros de esta familia

---

presentan un amplio espectro de inhibición frente a bacterias Gram (+) (*Propionibacterium acnés*, *Clostridium tertium*, *Poststreptococcus asacharolyticus* y *Poststreptococcus anaerobius*) y Gram (-) (*Staphylococcus* y *Streptococcus* spp.) [32].

### Actividad antiviral

La piel de los anfibios es poseedora de compuestos con fuertes propiedades antivirales. La *Brevinina 1*, es un péptido aislado de la *Rana brevipoda porsa* (Anura: Ranidae) con actividad antiviral frente al virus *Herpes simplex* 1 y 2 [33]. La *Esculentina-2P* (E2P) y *Ranateurina-2P* (R2P), dos PAMs aislados de *Rana pipiens* (Anura: Ranidae), mostraron la capacidad de inactivar el Ranavirus (FV3) y el Herpes virus del bagre de canal, actuando en pocos minutos, incluso a temperaturas por debajo de los 0 °C. Cabe destacar que E2P y R2P actúan inactivando directamente al virus y no por inhibición de la replicación de células infectadas [34].

La *Maximina 3* de *Bombina máxima* (Anura: Bombinatoridae), posee una significativa actividad anti-HIV [35]. Por otro lado, una novedosa hemoproteína (*BAS-AH*) de 63 kDa aislada de las secreciones del *Bufo andrewsi* (Anura: Bufonidae) presentó una inhibición dosis-dependiente sobre la infección del HIV-1 [36]. El hallazgo respecto que los péptidos de anfibios sean capaces de inhibir al virus del HIV, incluso cuando este se encuentra oculto en las células dendríticas, sugiere que estos podrían utilizarse como preventivos en las mucosas [37].

TABLA 1. Ejemplos de péptidos antimicrobianos y demás moléculas aislados a partir de secreciones de anfibios de diferentes familias.

Especies	Familia	Péptido	Estructura primaria	Actividad biológica	Referencia
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	Leptodactylidae	<i>Pentadactilina</i>	<i>GLLDTLKGAAKNVVGSLASKVMEKL</i>	Antitumoral	[38]
<i>Leptodactylus laticeps</i>		<i>Plasticina-L1</i>	<i>GLVNGLLSSVLGGGQGGGGLGGIL</i>	Antidiabética	[39]
		<i>Ocellatina-L2</i>	<i>GVVDILKGAAKDLAGHLATKVMMDKL</i>		
<i>Leptodactylus latrans</i>		<i>Ocellatina 1</i>	<i>GVVDILKGAGKDLLAHLVKGISEKV</i>	Antimicrobiana	[22]
		<i>Ocellatina 2</i>	<i>GVLDFKDAKQILAHAAEKQI</i>		
		<i>Ocellatina 3</i>	<i>GVLDFKNAAKNILAHAAEQI</i>		
		<i>P1-LI-1577</i>	<i>DEMKLDFGNMHE- NH2</i>		
		<i>P2-LI-1298</i>	<i>AAGKGLVSNLLEK- NH2</i>		
<i>Physalaemus nattereri</i>			<i>P3-LI-2085</i>	<i>GLLDFLKAAGKGLVSNLLEK-NH2</i>	
		<i>Antioxidina-I</i>	<i>TWYFITPYIPDK</i>	Antioxidante	[40]
<i>Agalychnis lemur</i>		<i>Dermaseptina-L1</i>	<i>GLWSKIKEAAKAAAGKAALNAVGLVNQGDQPS</i>	Antitumoral	[17]
		<i>Phylloseptin L1</i>	<i>LLGMIPLAISALS SKL</i>		
<i>Agalychnis litodryas</i>		<i>Dermaseptina</i>	<i>AVWKDFLKNIGKAAAGKAVLNSVTDMVNE</i>	Antidiabética	[41-42]
<i>Boana pulchella</i>		<i>Hp-1971</i>	<i>TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR-NH2</i>	Antimicrobiana - Inhibición enzimática	[29]
		<i>Hp-1935</i>	<i>KLSPSLGPVSKGKLLAGQR- NH2</i>		[43]
		<i>Hp-1891</i>	<i>RLGTALPALLKTLLAGLNG- NH2</i>		Antimicrobiana
<i>Cruziophyla calcarifer</i>	Hylidae	<i>RK-13</i>	<i>RRKPLFPLIPRPK</i>	Antidiabética	[44]
<i>Pesudis paradoxa</i>		<i>Psudina-2</i>	<i>GLNALKKVFQGIHEAIKLINNHVQ</i>	Antidiabética	[45]
<i>Phyllomedusa bicolor</i>		<i>Dermaseptina B2</i>	<i>GLWSKIKEVGEAAKAAKAAAGKAALGAVSEAV</i>	Antitumoral	[46]
	<i>Dermaseptina B3</i>	<i>ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAE</i>			
<i>Phyllomedusa sauvagii</i>		<i>Dermaseptina B</i>	<i>GLWSKIKEVGEAAKAAKAAAGKAALGAVSEAV</i>	Antimicrobiana	[27]
		<i>Dermatoxina</i>	<i>SLGSFLKGVGTTLASVGVVSDQF GKLLQAGQ</i>		[28]
		<i>Dermorfina</i>	<i>Y(d)AFGYPS</i>	Analgésica	[47]

**TABLA 1 (cont.).** Ejemplos de péptidos antimicrobianos y demás moléculas aislados a partir de secreciones de anfibios de diferentes familias (continuación).

<i>Nidirana pleuraden</i>		<i>Pleuraina-A1</i>	<i>S IITMTKEAKLPQLWKQIACRLYNTC</i>			
		<i>Pleuraina-D1</i>	<i>FLSGILKLAFKIPSVLCAVLKNC</i>	Antioxidante	[40]	
		<i>Pleuraina-G1</i>	<i>AKAWGIPPHVIPQIVPVIRIRPLCGNV</i>			
		<i>Pleuraina-R1</i>	<i>CVHWMNTARTACIAP</i>			
<i>Rana brevipoda porsa</i>	Ranidae	<i>Brevinina 1</i>	<i>FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKCC</i>		[33]	
<i>Rana pipiens</i>		<i>Esculentina-2P</i>	<i>GFSSIFRGVAKFASKGLGKDLARLGVNLVACKISKQC</i>	Antiviral	[34]	
		<i>Ranateurina-2P</i>	<i>GLMDTVKNVAKNLAGHMLDKLKCKITGC</i>			
<i>Rana sevosia</i>		<i>pLR</i>	<i>VRGCWTKSYPPKPCFVR</i>	Immunomodulatoria	[48]	
		<i>pYR</i>	<i>YLGKWCWTKSYPPKPCFSR</i>		[49]	
<i>Rana temporaria</i>		<i>Temporina-1Ja</i>	<i>ILPLVGNLLNDLL</i>	Antimicrobiano	[50]	
		<i>Magainina-1</i>	<i>GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS</i>	Antimicrobiana	[24]	
		<i>Magainina-2</i>	<i>GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS</i>			
<i>Xenopus laevis</i>	Pipidae	<i>PGLa</i>	<i>GMAKAGAIAGKIAKVALKAL</i>	Antiviral Antimicrobiana	[25] [34]	
		<i>CPF-1</i>	<i>GLASFLGKALKAGLKIGAHLLGGAPQQ</i>			
			<i>CPF-3</i>	<i>GFGSFLGKALKAAALKIGANALGGSPQQ</i>		
			<i>CPF-5</i>	<i>GFGSFLGKALKTALKIGANALGGSPQQ</i>	Antidiabética	[51]
			<i>CPF-6</i>	<i>GFASFLGKALKAAALKIGANMLGGAPQQ</i>		
			<i>CPF-7</i>	<i>GFGSFLGKALKAAALKIGANALGGAPQQ</i>		
	<i>Alytes obstetricans</i>	Alytidae	<i>Alyteserina-2a</i>	<i>ILGKLLSTAAGLLSNL</i>	Antidiabética	[52]
<i>Epipedobates tricolor</i>	Dendrobatidae	<i>Epibatidina</i>	-	Analgésica	[53]	
<i>Bombina máxima</i>	Bombinatoridae	<i>Maximina 3</i>	<i>GIGGKILSGLKTALKGAAKELASTYLH</i>	Antiviral	[35]	
<i>Bufo andrewsi</i>		<i>BAS-AH</i>	-	Antiviral	[36]	
<i>Bufo gargarizans</i>	Bufonidae	<i>Extracto</i>	-		[54]	
		<i>Cinobufagina</i>	-	Immunomodulatoria	[55]	
<i>Bufo melanostictus</i>		<i>Extracto</i>	-		[56]	

---

### Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de las secreciones de las pieles de anfibios se remonta a los principios de la medicina china, y con el transcurrir de los años y el avance de las tecnologías se han ido logrando aislar los compuestos responsables de dicha bioactividad. Varios de los compuestos aislados son poseedores de un amplio potencial terapéutico [7].

La *Pentadactilina*, péptido aislado a partir de *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) ha presentado elevada actividad citotóxica frente a células de melanoma [38].

La *Dermaseptina L1* y la *Phylloseptina L1*, péptidos de *Agalychnis lemur* (Anura: Hylidae) poseen actividad anti-hepatocarcinogénica [17]. Por otro lado, las *Dermaseptinas B2* y *B3* de *Phyllomedusa bicolor* (Anura: Hylidae) presentan tanto propiedades antitumorales como angiostáticas, e inhiben la proliferación de adenocarcinoma prostático [46].

### Actividad inmunomodulatoria

Secreciones del *Bufo gargarizans* (Anura: Bufonidae) son capaces de activar la proliferación de linfocitos. Estas incrementan los niveles de IL-2 e IL-12 en el sobrenadante de cultivo de células de bazo, y aumentan la actividad de células *natural killer* en ratones C3H / HeN. Estos estudios evidencian que las secreciones de dicha especie contienen sustancias inmunopotenciadoras que servirían como inmunomoduladoras en un organismo [54]. La *Cinobufagina*, es un esteroide también presente en las secreciones del *Bufo gargarizans*, que ha resultado exitoso, a elevadas dosis, en la atenuación y tratamiento de infecciones en pacientes con granulocitopenia en combinación con la quimioterapia. En estos pacientes, después del tratamiento con altas dosis de *Cinobufagina*, la infección se redujo significativamente con un importante cambio en el número de granulocitos antes y después del tratamiento [55].

Extractos de la piel del *Bufo melanostictus* (Anura: Bufonidae), lograron un incremento significativo en el número de linfocitos sanguíneos, linfocitos de bazo y macrófagos, en animales experimentales. Debido a su propiedad quimiotáctica positiva, a la capacidad de formar rosetas de células T negativas y a su propiedad de inhibición de los macrófagos, se sugiere que el extracto de *B. melanostictus* posee compuestos inmunopotenciadores [56].

La utilización del octadecapéptido *pLR*, purificado de *Rana pipiens*, produce una inmediata liberación de histamina, teniendo una potencia doblemente mayor en comparación con uno de los péptidos liberadores de histamina más activos, la *Melitina* [48]. Otro octadecapéptido, *pYR*, aislado de las secreciones de *Rana sevoosa* (Anura: Ranidae) es capaz de liberar histamina de los mastocitos peritoneales de ratas, e inhibir el desarrollo temprano de macrófagos granulocitos a partir de células madre de médula ósea [49].

### Actividad analgésica

La piel de los anfibios funciona como un poderoso analgésico [15]. La *Dermorfina* en un heptapéptido aislado de la rana amazónica *Phyllomedusa sauvagei*. Este péptido resulto ser más potente que la met-enkefalina, leu-enkefalina, betaendorfina y la morfina en algunos casos, produciendo un estado analgésico de larga duración [15].

Otro analgésico no opioide, la *Epibatidina*, es un alcaloide aislado del veneno de la rana ecuatoriana *Epipedobates tricolor* (Anura: Dendrobatidae), el cual mostró alta potencialidad analgésica mediante los receptores nicotínicos, siendo 120 veces más potente y duradero que la actividad analgésica de la nicotina [57]. Las *Epibatidinas*, tienen baja actividad sobre otros receptores, como son los opioides, muscarínicos, adrenérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos y del ácido gama aminobutírico [58].

Por otro lado, la mayoría de las ranas del género *Litoria* contienen un neuropéptido del grupo *Caeruleína*, que se encuentra en muchas especies de ranas en todo el mundo. Este neuropéptido es un analgésico mil veces más potente que la morfina y ha sido utilizado durante cirugías de la vesícula biliar [59].

### Actividad antidiabética

Varios péptidos insulínotropicos han sido aislados de las pieles de ranas y sapos. La *Alyteserina-2a* obtenida de la especie *Alytes obstetricans* (Anura: Alytidae), así como también péptidos pertenecientes a *X. laevis* han sido capaces de producir una estimulación en el tiempo de liberación de insulina [51-52].

De la familia Leptodactylidae, la *Plasticina-L1* de *Leptodactylus laticeps*, es capaz de incrementar la tasa de liberación de insulina inducida por glucosa en células BRIN-BD11, sin la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), lo que indica una

---

preservación de la membrana plasmática. Además, la *Ocelletina L2* es también capaz de estimular la liberación de insulina en BRIN-BD11 [39].

Para la familia Hylidae, se han identificado péptidos con un significativo efecto insulinotrópico en especies de la subfamilia Phyllomedusidae: *Phyllomedusa trinitatis* [41], *Agalychnis litodryas* [42] y *Cruziohyla calcarifer* [44]. Como ejemplo se puede mencionar, la *Psudina-2* aislada de la rana *Pseudis paradoxa* (Anura: Hylidae) que mostró actividad liberadora de insulina en células BRIN-BD11 [44].

### Actividad antioxidante

La piel de los anfibios juega un rol fundamental en la protección del organismo frente a factores externos dañinos, siendo la primera barrera de defensa. Debido a esto, su piel cuenta con moléculas con capacidad antioxidantes, que no solo son de una elevada actividad, sino que también de rápida acción, para contrarrestar los radicales libres externos [40].

El péptido *Antioxidina-I* aislado de la especie *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae), presenta una potente actividad antioxidante [60]. Otra familia de péptidos, con más de diez análogos de una notable actividad antioxidante son las *Pleurainas* aisladas de la rana *Nidirana pleuraden* (Anura: Ranidae) [40].

### Actividad inhibitoria de enzimas

En el último tiempo las secreciones de las pieles de anfibios y en particular los péptidos derivados de las mismas han demostrado tener capacidad de actuar como inhibidores enzimáticos.

El extracto de la especie *Boana pulchella* de la familia Hylidae demostró poseer actividad inhibitoria frente a las enzimas acetil y butiril colinesterasa involucradas en la Enfermedad de Alzheimer [61]. Dos péptidos de suma importancia fueron aislados de los extractos de *B. pulchella*, *Hp-1971* y *Hp-1935*, los cuales resultaron ser los responsables de la actividad inhibitoria de las colinesterasas [43; 62].

## La Enfermedad de Alzheimer

La demencia es un síndrome, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, caracterizado por el deterioro de las funciones cognitivas que no constituye una consecuencia del envejecimiento normal. Esto incluye la alteración de múltiples

---

funciones cerebrales, como la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio [63].

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a la demencia como una prioridad de salud pública. El informe de la OMS: “*Dementia: a public health priority*” publicado en 2012 tiene como objetivo brindar información y concientizar sobre esta grave problemática [64]. En mayo de 2017, la Asamblea Mundial de la Salud respaldó el Plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública a la demencia 2017-2025 [65].

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, representando entre un 60 y un 70 % de los casos. La EA es un trastorno cerebral neurodegenerativo progresivo y es la principal causa de déficits cognitivos, pérdida de memoria y alteraciones del comportamiento, que aumentan sustancialmente en personas mayores a los 65 años [65-67]. La EA debe diferenciarse de la disminución normal de la función cognitiva relacionada con la edad, que es más gradual y se asocia a menores discapacidades. La Enfermedad a menudo comienza con síntomas leves y termina con daño cerebral severo. Las personas con este tipo de demencia pierden sus capacidades a ritmos diferentes [63; 67].

La EA representa un enorme desafío sanitario, afectando a nivel mundial a más de 47,5 millones de personas, y cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos, provocando importantes repercusiones sociales y económicas. En 2015 el costo social total mundial se estimó en US\$ 818.000 millones, es decir el 1,1 % del PBI global [65].

No existe cura para la EA, y en la actualidad solamente hay cinco fármacos aprobados para su tratamiento. Estos solamente son paliativos utilizados para retrasar la sintomatología en los pacientes, pero no detienen la progresión de la enfermedad [68]. El desarrollo de fármacos para esta enfermedad enfrenta una de las tasas de fracaso más altas respecto a cualquier otra área terapéutica, lo cual se asocia al hecho de que las causas exactas de la EA aún son poco conocidas. Como resultado, los candidatos a medicamentos pueden estar diseñados para el objetivo equivocado, o al menos para un único objetivo de la enfermedad [68-69].

Diferentes estudios llevados a cabo a lo largo de las últimas décadas sobre los pacientes con EA han permitido develar que esta es una compleja enfermedad de



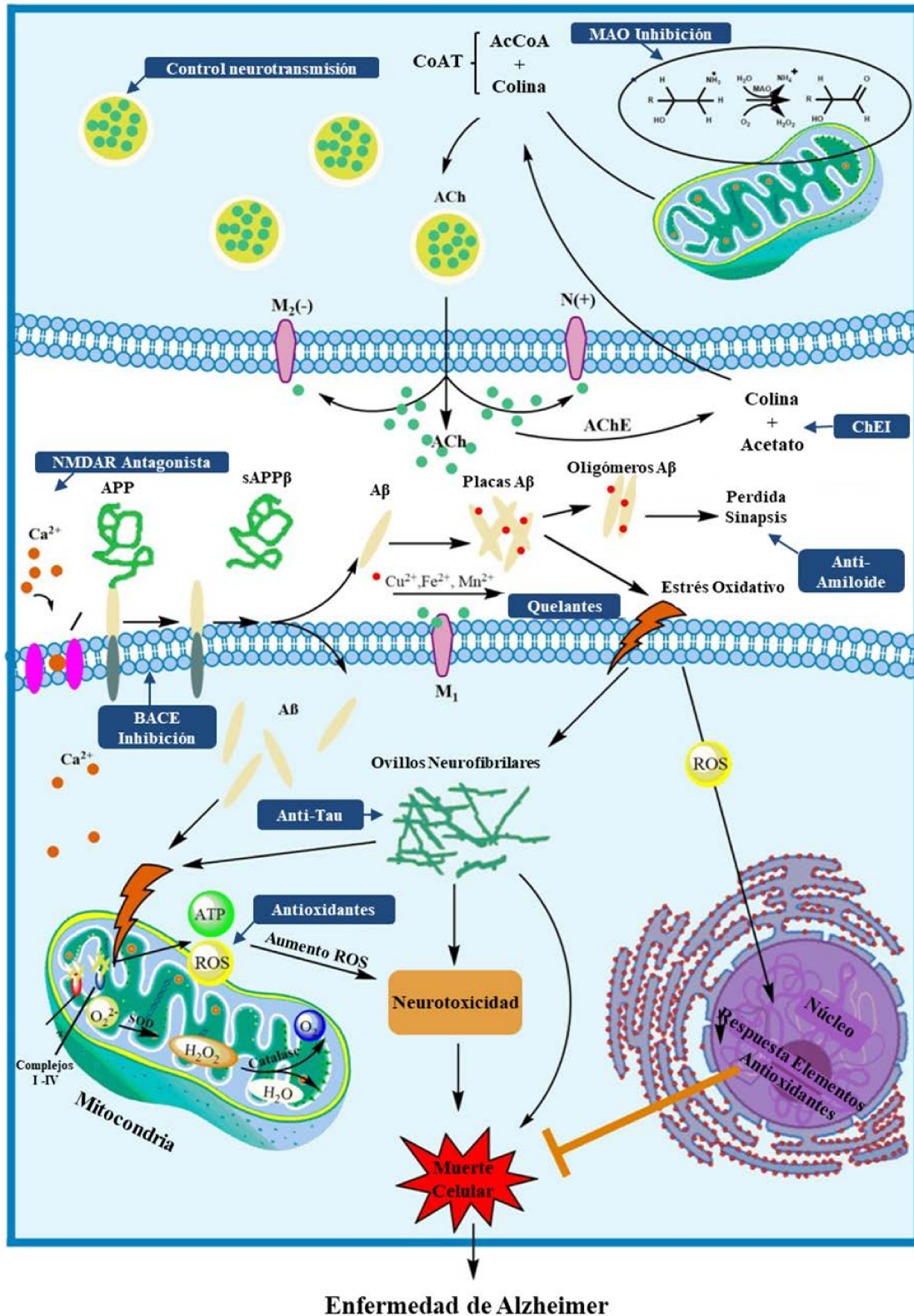


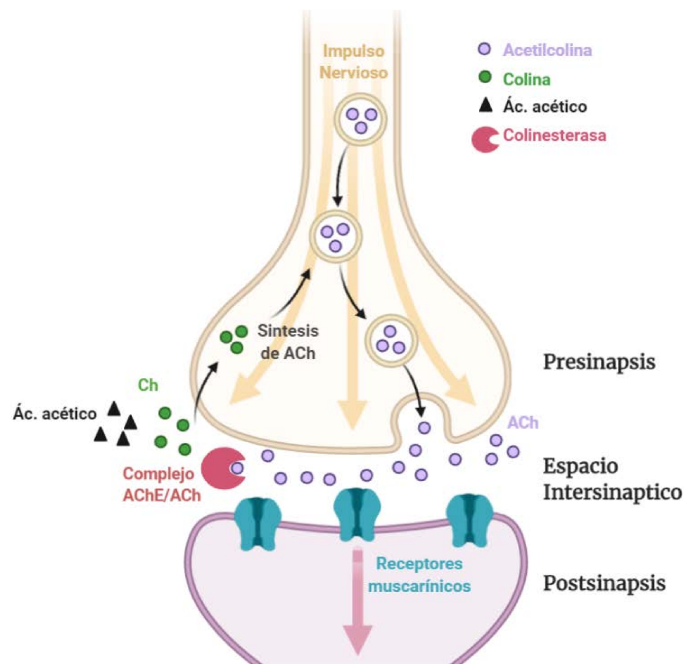
FIGURA 4. Vías patológicas involucradas en la Enfermedad de Alzheimer (EA) y posibles blancos terapéuticos (Figura modificada de Jalili-Baleh y col., 2018).

naturaleza multifactorial que involucra diferentes vías patológicas. Algunos de los factores patológicos principales son, el déficit de neurotransmisores colinérgicos, la

formación de agregados amiloides, la agregación de microtúbulos por hiperfosforilación de la proteína Tau, neuroinflamación y estrés oxidativo, disrupción de la homeostasis del calcio y dishomeostasis de biometales (iones cobre, hierro y zinc). Es por esto que, hoy en día las investigaciones anti-EA se enfocan en la búsqueda de inhibidores multi objetivos que generen una modulación simultánea de las vías involucradas [68-69]. La Figura 4 esquematiza las diferentes vías patológicas involucradas para la EA.

### Teoría Colinérgica

El sistema colinérgico cerebral basal está compuesto por el núcleo básico de Meynert (NBM), las bandas diagonales (horizontales y verticales) de Broca (HDBB y VDBB, respectivamente), y el núcleo septal medio (MS) [70]. Este sistema neuronal proporciona las inervaciones colinérgicas primarias, tanto a las estructuras límbicas como a las corticales del cerebro. El neurotransmisor más importante de este sistema es la acetilcolina (ACh). Se trata de un éster de acetil coenzima A (acetil-CoA) y colina con fórmula química  $C_7NH_{16}O_2^+$ . Este, se sintetiza por acción de la enzima colina acetiltransferasa (CAT). En la terminal presináptica, la CAT sintetiza la ACh a partir de colina (Ch) y acetilCoA [71]. La ACh se acumula en vesículas y es liberada a través de potenciales de acción al espacio intersináptico, donde posteriormente se une con los receptores muscarínicos en la terminal postsináptica. El exceso ACh es hidrolizado por la acción de una colinesterasa soluble o anclada a la membrana pre y postsináptica. Finalmente, la colina es recapturada por un transporte de alta afinidad presente en la presinápsis [72] (Figura 5).



**FIGURA 5.** Esquema de una sinapsis colinérgica (Figura creada con BioRender.com).

La ACh en el cerebro altera la excitabilidad neuronal, influye en la transmisión sináptica, induce la plasticidad sináptica y coordina la activación de grupos de neuronas. Como resultado, cambia el estado de las redes neuronales en todo el cerebro y modifica su respuesta a los estímulos internos y externos. Los diversos efectos de este neuromodulador dependen del sitio de liberación, los subtipos de receptores y la población neuronal que tenga como blanco; sin embargo, en cuestiones generales la ACh potencia los comportamientos involucrados en la adaptación a los estímulos ambientales y disminuye las respuestas a los estímulos, en curso, que no requieren acción inmediata. La capacidad de la ACh para coordinar la respuesta de las redes neuronales en muchas áreas del cerebro hace de la modulación colinérgica un mecanismo esencial que subyace a los comportamientos más complejos [73].

La hipótesis colinérgica indica que el deterioro de las funciones cognitivas y los trastornos del comportamiento que afectan a los pacientes con EA se deben, en parte, a deficiencias corticales en la neurotransmisión colinérgica [74-75]. Esta hipótesis sugiere que hay un deterioro del sistema neuronal colinérgico en el cerebro basal de los pacientes con EA; hecho que también se encuentra relacionado con la acumulación del péptido A $\beta$  y Tau [74; 76].

Las colinesterasas, acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE), catalizan la rápida hidrólisis de ACh, de esta manera, inactivan el neurotransmisor luego

---

de su liberación al espacio intersináptico, para evitar un exceso de estimulación colinérgica (Figura 5) [77]. En pacientes que padecen EA se ha observado un aumento de la actividad de las colinesterasas. Debido a esto, la hipótesis colinérgica expresa que una exacerbada actividad de estas enzimas, en personas con este tipo de demencia senil causa un descenso de los niveles fisiológicos de ACh; lo que conlleva a la pérdida de las funciones cognitivas [78]. Por este motivo, el desarrollo farmacológico de drogas para el tratamiento de la EA se ha enfocado en el desarrollo de fármacos capaces de aumentar los niveles de ACh de los pacientes, siendo de gran interés los compuestos capaces de inhibir las enzimas colinesterasas [79].

Los inhibidores de la AChE son uno de los compuestos más investigados en la búsqueda para un tratamiento eficaz de la EA. La BChE también se considera un objetivo prometedor para el descubrimiento de fármacos para la EA, ya que la actividad de esta enzima aumenta en las últimas etapas de la EA, además de ser capaz de tomar el rol de la AChE cuando esta se encuentra inhibida. Esto implica que los inhibidores de la BChE podrían actuar de forma similar a los inhibidores de la AChE, en particular para ralentizar el declive cognitivo [80].

### Enzimas colinesterasas

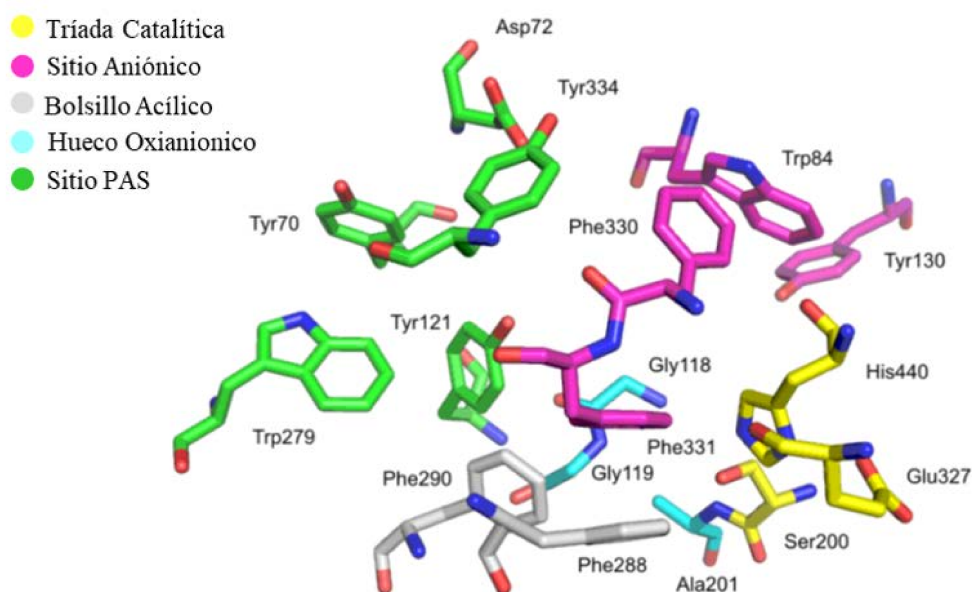
Las colinesterasas de vertebrados se clasifican dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos principales, que son codificadas por genes distintos: la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolina hidrolasa o acetilcolina acetilhidrolasa (EC 3.1.1.7), que hidroliza a la acetilcolina mucho más rápido que a otros ésteres de colina; y la colinesterasa plasmática o sérica, pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa (BChE) (EC 3.1.1.8) que hidroliza tanto a la butirilcolina como la acetilcolina [79]. La AChE y la BChE humanas tienen una homología en su composición aminoacídica del 54 % [81]. Ambas se encuentran predominantemente como tetrámeros, pero también son comunes en sus formas diméricas y monoméricas. Estas enzimas son hidrolasas de serina, su proceso catalítico implica acilación y desacilación en un residuo de serina de la triada catalítica en el centro activo de la enzima [79].

La AChE se encuentra en altas concentraciones principalmente en los glóbulos rojos, así como en el cerebro en las uniones neuromusculares y en la sinapsis colinérgica. Por otro lado, la BChE existe de manera ubicua en todo el cuerpo (en el hígado, suero

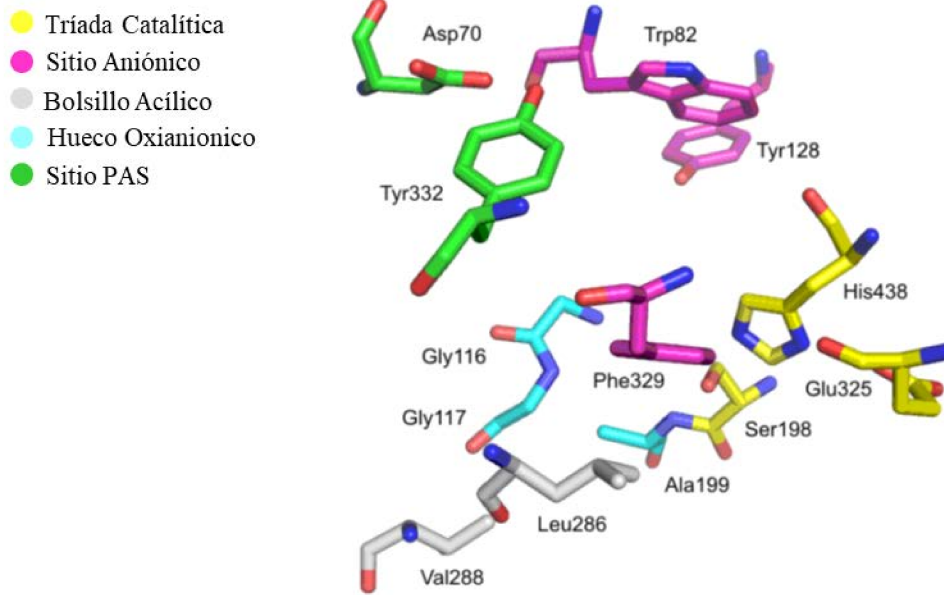
sanguíneo, páncreas y sistema nervioso central humanos). En el cerebro, la BChE se asocia principalmente con células gliales y células endoteliales [82].

La estructura de AChE fue descrita por primera vez en 1991 por J. Sussman, quien cristalizó con éxito la enzima de la especie *Tetronarce californica* (TcAChE) [83]. TcAChE está compuesta por 537 aminoácidos y contiene 12 láminas  $\beta$  rodeadas por 14 hélices  $\alpha$ , y aunque posee el 58 % de homología con la enzima humana, los sitios claves están conservados. En el caso de la BChE, su estructura fue dilucidada más tarde, por lo que en un principio todos los análisis estructurales se realizaron con un modelo homólogo de BChE basado en la acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* [84].

Actualmente se conoce que el sitio activo catalítico (CAS) de las colinesterasas consta de dos subsitios principales, el subsitio "esteárico" y el subsitio "aniónico", correspondientes a la maquinaria catalítica y al sitio de unión del sustrato, respectivamente [85]. La reacción de hidrólisis tiene lugar en el sitio esteárico, el mismo se ubica en el fondo de una "garganta" (o en inglés, *gorge*) profunda y estrecha (20 Å de profundidad, 5 Å de ancho), que es rica en aminoácidos aromáticos conservados. Allí se encuentran los aminoácidos: Ser200, His440 y Glu327 (TcAChE), que crean la tríada catalítica (Figura 6 y 7). Estos residuos están involucrados en la transferencia del grupo acetilo de acetilcolina a Ser200. La tríada catalítica de BChE humana (hBChE) está formada por Ser198, His438 y Glu325 [85].



**FIGURA 6.** Residuos importantes en la actividad catalítica de tcAChE (Figura modificada de Bajda y col., 2013).



**FIGURA 7.** Residuos importantes en la actividad catalítica de hBChE (Figura modificada de Bajda y col., 2013).

Por su parte el subsitio aniónico, compuesto por Trp84, Tyr130, Phe330 y Phe331, en la TcAChE es el responsable de unir el grupo amonio cuaternario del sustrato con interacciones catión  $-\pi$ . Debido a las interacciones con este sitio, se proporciona la orientación adecuada de acetilcolina en el *gorge*. También permite la unión de inhibidores a la enzima. En hBChE, el residuo clave de triptófano (Trp82) se conserva, pero una fenilalanina (Phe330) se reemplaza por Ala328. La falta de esta fenilalanina influye en la afinidad de algunos inhibidores. Por ejemplo, la Huperzina se caracteriza por una alta afinidad con AChE, ya que su amina primaria protonada crea fuertes interacciones con Phe330 de TcAChE, mientras que la afinidad con hBChE es menor, debido a la presencia de Ala328 en este lugar [86-87].

Una de las características de las serinas hidrolasas, es la estabilización del estado de transición por los aminoácidos del orificio oxianiónico, a través de la creación de enlaces puente de hidrógeno. Durante la reacción enzimática, el complejo de transición es generado y estabilizado por los residuos Gly118, Gly119 y Ala201 de AChE. En hBChE, el orificio oxianiónico es similar y consiste en dipolos de N-H altamente conservados, derivados de aminoácidos de la cadena principal: Gly116, Gly117 y Ala119 [85].

El bolsillo acílico, es responsable de la especificidad del sustrato (Figuras 6 y 7). Aquí radica una de las diferencias principales entre las colinesterasas, el canal de residuos

aromáticos o *gorge* es más grande en hBChE que en TcAChE (500 Å<sup>3</sup> frente a 300 Å<sup>3</sup>). El sitio activo de la TcAChE se encuentra al final de un bolsillo acílico formado por 14 residuos aromáticos; en hBChE seis de estos residuos son reemplazados por residuos alifáticos más pequeños, incluso polares [88]. La forma del bolsillo acílico es principalmente determinada por dos residuos: en TcAChE estos son los aminoácidos aromáticos Phe288 y Phe290, mientras que en hBChE los residuos alifáticos Leu286 y Val288. Los residuos Phe288 y Phe290 evitan el acceso de moléculas de mayor tamaño al centro catalítico. En el caso de hBChE, la sustitución de los dos residuos de fenilalanina por los aminoácidos más pequeños, valina y leucina, hace que el *gorge* sea más grande y permita la entrada de moléculas más grandes, lo que resulta en una menor especificidad de sustrato [85].

Otro sitio de suma importancia es el sitio aniónico periférico (PAS), que consiste en cinco aminoácidos para el caso de TcAChE: Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 y Tyr334. El PAS se encuentra en la entrada del *gorge* y es responsable de posicionar correctamente al sustrato para su interacción con el sitio catalítico [83; 89]. BChE no posee contrapartes de Tyr70, Tyr121 y Trp279 en el sitio periférico. Por otro lado, el PAS además de estar involucrado en la función catalítica, está directamente implicado en la estimulación de la formación y agregación del péptido  $\beta$ -amiloide y en el aumento de la neurotoxicidad de las fibrillas amiloides [89]. En 2011 Carvajal e Inestrosa describieron cómo mediante el sitio PAS la AChE actúa como chaperona en el proceso de agregación del péptido  $\beta$ -amiloide [78]. Estas propiedades convierten a este sitio en un blanco molecular de muchos inhibidores, y de gran interés para el tratamiento de la EA.

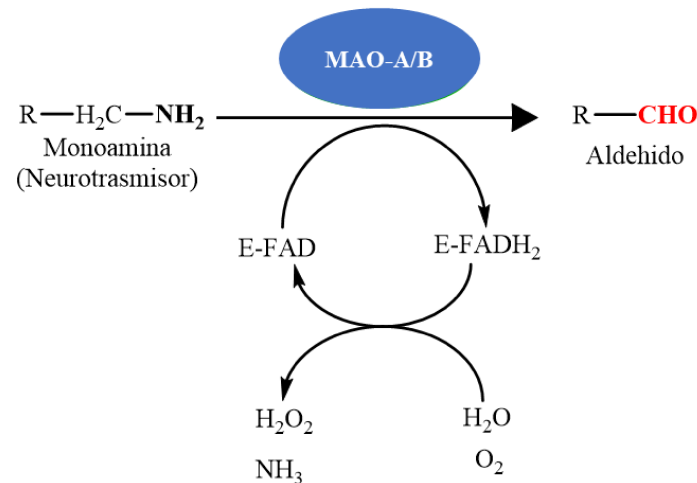
### Inhibidores de colinesterasas

Actualmente, tres de los cinco medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para combatir los síntomas de la EA son inhibidores de las colinesterasas. Estos son el Donepezilo, la Galantamina y la Rivastigmina; el primer compuesto es inhibidor de la AChE, mientras que los últimos dos son inhibidores duales, ya que actúan frente a ambas colinesterasas (AChE y BChE). Otro es la Memantina, que actúa por un mecanismo de bloqueo de los receptores de glutamato, un neurotransmisor involucrado en procesos de aprendizaje y memoria. Y el último medicamento, es simplemente una combinación de Memantina y Donepezilo [90]. Todos estos fármacos

logran una mejora paliativa del problema, por lo que no curan la enfermedad, que por el momento sigue siendo incurable.

## Monoamino Oxidasas

Las enzimas monoamino oxidasas (MAOs) (EC 1.4.3.4), son flavoproteínas responsables de la desaminación de compuestos biogénicos y aminas xenobióticas. Estas juegan un rol clave en el metabolismo de las aminas neuroactivas, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en tejidos periféricos. Estas se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos animales, y llevan a cabo la catálisis de aminas primarias mediante una desaminación oxidativa en presencia de oxígeno molecular, dando como resultado el aldehído correspondiente, amoniac y peróxido de hidrogeno (Figura 8) [91].



**FIGURA 8.** Reacción general de desaminación oxidativa catalizada por las monoaminas oxidasas (MAOs). Representaciones realizadas con ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

El principal objetivo de las MAOs es la degradación de neurotransmisores específicos como ser la dopamina, epinefrina, norepinefrina, serotonina, y la  $\beta$ -feniletilamina [91]. Debido a esto, están implicadas y modulan diferentes trastornos socio-fisiológicos como ser: desórdenes en el estado de ánimo [92], ansiedad [93], depresión [94], esquizofrenia [95], desordenes de atención o hiperactividad [96], migraña [97] y enfermedades neurodegenerativas [98]. Esto las convierte en un blanco terapéutico de gran interés.

En humanos, las MAOs coexisten en dos isoformas, MAO-A y MAO-B, que difieren en su secuencia aminoacídica (homología de secuencia del 72 %), su estructura tridimensional, la distribución en los tejidos y su especificidad de sustratos [99]. En el SNC, la MAO-A se encuentra preferentemente en las neuronas catecolaminérgicas,



---

mientras que la MAO-B se encuentra localizada principalmente en la glía y en las neuronas serotoninérgicas [91].

Diversos estudios realizados en pacientes con EA han demostrado que la actividad de las MAOs, y principalmente de la MAO-B, se ve incrementada en neuronas. Además esta condición se ve agravada a medida que los pacientes avanzan en edad [100]. Se conoce que el aumento en su actividad es debido a que los niveles enzimáticos, así como también el ARNm se ven incrementados en el cerebro enfermo, asociándose esto a anomalías transcripcionales o post-transcripcionales [101]. Por lo cual actualmente, la medicina ha propuesto a las MAO-B como un biomarcador diagnóstico de la EA [91].

Como consecuencias de la exacerbada actividad de la MAO-B se producen diferentes trastornos como, el aumento de la disfunción cognitiva [91], la destrucción de neuronas colinérgicas [102], el incremento de la actividad de las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, lo que genera un desequilibrio en el sistema colinérgico formando placas amiloides [103-104], y fundamentalmente produce un desequilibrio en el estrés oxidativo, acelerando notablemente la desaminación de neurotransmisores y generando grandes cantidades de radicales libres que conllevan a un deterioro y muerte neuronal [105].

En los últimos años esta enzima ha cobrado gran protagonismo en la búsqueda de compuestos que permitan inhibir su actividad. Tratamientos con fármacos como la Rasagilina o la Selegilina, dos inhibidores comerciales de la MAO-B, han demostrado retrasar la neurodegeneración en pacientes con EA [106].

### Las enzimas como blancos terapéuticos

La primera característica de las enzimas que contribuye a su gran atractivo como blancos de medicamentos es su precedente histórico. A través del ensayo y error, y a través de intentos más modernos en la farmacología sistemática, las enzimas emergen una y otra vez como los objetivos preferidos a la hora del diseño de fármacos. Adicionalmente las enzimas son excelentes blancos para la intervención farmacológica, debido a su papel esencial en los procesos vitales y en la fisiopatología. Sin embargo, el atractivo de las enzimas como blancos de los medicamentos se debe no sólo a la esencialidad de su actividad catalítica, sino también al hecho de que las enzimas, por su misma naturaleza, son altamente susceptibles a la inhibición por compuestos de pequeño peso molecular. Debido a esto, las enzimas suelen ser el objetivo de los esfuerzos de diseño y

---

descubrimiento de nuevos fármacos en las principales regiones del mundo [107]. Para el correcto desarrollo, diseño y evaluación del potencial terapéutico del inhibidor enzimático es necesario conocer todos los aspectos de una reacción enzimática y de qué manera un inhibidor puede afectar la misma.

### Agentes antioxidantes y quelantes

El estrés oxidativo se encuentra asociado a diversas condiciones patológicas, como son el cáncer, enfermedades neurológicas, diabetes, y asma, entre otros [108]. Este es causado por un desbalance entre los agentes pro-oxidantes y los antioxidantes, resultando en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres que son potencialmente dañinos para los componentes celulares (ADN, lípidos, proteínas, etc.) [108].

Las ROS son las principales responsables del estrés oxidativo, y pueden ser generadas mediante factores externos como medioambientales, la luz UV, compuestos químicos, y organismos infecciosos; o también pueden ser inducidos de manera intrínseca, por la sobreestimulación de la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias y actividades enzimáticas (NADH oxidasa, Xantina oxidasa, etc.) [108]. Las ROS incluyen especies como son el peróxido de hidrogeno, óxido nítrico, aniones superóxido, y radicales hidroxilos y monóxidos [68].

El cerebro es un órgano particularmente susceptible al estrés oxidativo por parte de las ROS, ya que este posee altos niveles de ácidos grasos insaturados los cuales son muy lábiles a sufrir una peroxidación lipídica en presencia de radicales libres [109]. Además, se ha visto que los radicales libres son capaces de atacar a los residuos de aminoácidos produciendo una ruptura peptídica en las proteínas [110]. Estos factores han sido asociados a diversas enfermedades neurodegenerativas [68].

El cerebro de pacientes con EA presenta un extensivo deterioro por estrés oxidativo. Las ROS juegan un importante papel en la activación de las enzimas BACE-1 y  $\gamma$ -secretasa, incrementando la formación del péptido A $\beta$  y sus agregados en las placas seniles [111]. Por otro lado, también es importante destacar que el péptido A $\beta$ , así como también la actividad exacerbada de la MAO-B son capaces de elevar significativamente la producción de ROS, lo que beneficia al aumento del estrés oxidativo y a la muerte neuronal [111]. Es por esto, que el uso de agentes antioxidantes, como las vitaminas C,

K, A, y Coenzima Q10, en combinación con otros fármacos constituye una estrategia utilizada en la terapia de pacientes con EA [112].

Recientemente, se ha evidenciado una elevada concentración de iones metálicos de hierro, cobre y zinc en cerebros enfermos con EA, que contribuye a la patología [113]. La anormal acumulación de estos metales es capaz de acelerar la formación de agregados amiloides, dado a que la A $\beta$  es una metaloproteína redox activa, la interacción con metales resulta en su autoagregación y oligomerización, promoviendo la disfunción cerebral mediante la inflamación y activando vías metabólicas [114]. Por otro lado, estos biometales incrementan la formación de los ovillos neurofibrilares a través de la unión a la proteína Tau hiperfosforilada. Además, se sugiere que los iones Fe<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup> se encuentran involucrados en la producción de ROS [113]. Especialmente, el Fe<sup>2+</sup> produce radicales hidroxilos a través de la reacción de Fenton, acelerando la peroxidación de lípidos y promoviendo el daño oxidativo en grandes niveles. Por todo esto, se propone a la modulación de estos biometales en el cerebro, a través de agentes quelantes, como otra de las estrategias para la EA [115].

# OBJETIVOS

La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

## OBJETIVOS

### GENERALES

- Avanzar en el conocimiento acerca de la potencialidad de las pieles de anfibios como nuevas fuentes de péptidos con actividad biológica, con aplicaciones en salud humana.

### ESPECÍFICOS

- Desarrollar y optimizar protocolos para el aislamiento, purificación y caracterización de péptidos con capacidad inhibitoria de enzimas a partir de anfibios anuros.
- Evaluar y estudiar la actividad inhibitoria de los extractos de pieles de anfibios, así como también de sus análogos sintéticos, frente a enzimas implicadas en diferentes patologías.
- Poner a punto nuevos ensayos biológicos a fin de ampliar el espectro de actividades biológicas de las pieles de anfibios y sus análogos sintéticos.
- Evaluar la toxicidad de las pieles de anfibios y análogos sintéticos de mayor actividad biológica.
- Realizar estudios de estructura-función de péptidos con mayor actividad inhibitoria frente a enzimas, mediante estudios computacionales.

# CAPÍTULO I

Aislamiento, caracterización y  
purificación de extractos de  
pieles de anfibios

Lic. Roque Spinelli

# CAPÍTULO I

## Introducción

Aislamiento, caracterización y  
purificación de extractos de  
pieles de anfibios

Lic. Roque Spinelli

# I: INTRODUCCIÓN

## I.1. Especies consideradas en el estudio

### Orden anura, familia Hylidae

Hylidae es una de las familias de anuros más numerosas, con 1014 especies distribuidas en 53 géneros. Esta familia de anuros es conocida como “ranas trepadoras”, y es una de la más ampliamente extendida por América [4]. Van de pequeñas a grandes en tamaño, la mayoría de ellas poseen los dedos de las patas con forma de discos, los cuales les dan propiedades adhesivas que las ayudan en el ascenso [4]. Esta familia se organiza taxonómicamente en tres subfamilias: Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hylinae. Dentro de las cuales, Hylinae, es la subfamilia con distribución más amplia (Norte, Centro y Sur América, Eurasia y el norte de África). Hylinae posee cerca de 200 especies. Sólo el género *Hyla* se encuentra fuera de América. Uno de los miembros más inusuales de este grupo es la rana paradójica (*Pseudis paradoxa*), cuyos renacuajos alcanzan un tamaño enorme de hasta 250 mm, pero posteriormente luego de la metamorfosis los adultos son 3 a 4 veces más pequeños [4; 116].

#### *Boana cordobae* (Barrio, 1965)

*Boana cordobae* (Bc) (Figura 9) pertenece a la subfamilia Hylinae. Es también conocida como “rana trepadora”, posee un amplio tamaño, que llega hasta los 120 mm de longitud hocico-cloaca (en inglés, *snout-vent length* o SVL). Las ranas de esta especie luego de la metamorfosis presentan una gran diversidad de patrones de coloración, desde ejemplares completamente verdes, hasta animales de color amarillo con manchas marrones y un reticulado negro en los muslos.

Distribución y hábitat: su presencia es muy frecuente en las Sierras de Córdoba y San Luis (Argentina), de allí su nombre. Esta especie vive en el bosque serrano y en los pastizales de altura de las sierras, entre los 700 y los 2700 m sobre el nivel del mar. Los machos de esta especie vocalizan ocultos entre la vegetación de los ríos y arroyos serranos [116].





**FIGURA 9.** Imagen de *Boana cordobae*. (Figura modificada de <http://sib.gov.ar>)

### *Pseudis minuta* (Günther, 1858)

*Pseudis minuta* (Pm) (Figura 10), pertenece a la subfamilia Hyliinae y es conocida como “rana boyadora grande”. Es un anfibio de tamaño medio, la longitud SVL en los machos varía entre 25 a 40 mm, mientras que para las hembras oscila entre 30 a 50 mm. Sus características morfológicas más distinguibles son la presencia de una membrana interdigital muy desarrollada (llega hasta la punta de los dedos) en las patas traseras, y los ojos en posición dorsal. La coloración general del cuerpo es verde, con manchas irregulares más oscuras. Algunos ejemplares presentan una banda dorsal longitudinal de color marrón-dorado. Las patas traseras tienen un patrón de bandas longitudinales [117].

Se alimenta principalmente de insectos, gusanos, pequeños peces, huevos de otras ranas, etc.

Distribución y hábitat: presentan una amplia distribución en Argentina (Buenos aires, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe), Brasil y Uruguay. Sus hábitats naturales incluyen pantanos cálidos, ríos, lagos y marismas de agua dulce, aguas estancadas de pastizales y tierras agrícolas inundadas. Se encuentra dentro de las ranas con hábitos casi exclusivamente acuáticos [118].



**FIGURA 10.** Imagen de *Pseudis minuta* o “rana boyadora” (Figura modificada de <http://calphotos.berkeley.edu>).

---

## Orden Anura, familia Leptodactylidae

Esta gran y diversa familia de anfibios anuros del nuevo mundo, actualmente está compuesta por 223 especies y 14 géneros, que habitan desde la Argentina hasta el sur de Texas. La mayoría son de hábitos terrestres, cuya ubicación es específica de la especie y varía ampliamente (superficie del agua, en los agujeros de los árboles, en el follaje sobre los arroyos, etc.) [4]. Se caracterizan por tener piel lisa en el vientre y sus dedos carecen de discos expandidos y membranas, tanto en extremidades anteriores como posteriores. Son grandes saltadoras, por lo cual poseen extremidades traseras robustas. Sus larvas son generalmente acuáticas, aunque en algunas especies el desarrollo es completamente terrestre. Algunas tienen renacuajos que pueden ser larvas endotróficas, es decir que no se alimentan [119]. Se sabe que los *Leptodactylus* crean nidos de espuma hechos de secreciones cloacales. Al ser manipulados secretan por su piel sustancias tóxicas que contienen aminos y péptidos [14]. En Argentina podemos encontrar varias especies de *Leptodactylus*, las más representativas de la región son: *Leptodactylus latrans* “rana criolla”, *Leptodactylus mystacinus* “rana de bigote” y *Leptodactylus chaquensis* [4].

### *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815)

*Leptodactylus latrans* (L) (Figura 11), posee dimensiones SVL que varían de 80 a 110 mm en hembras y de 90 a 120 mm en machos. Los machos tienen los antebrazos fuertemente desarrollados y poseen dos espinas negras en el primer dedo. Poseen dorso oscuro, gris o marrón rojizo con pliegues prominentes longitudinales y grandes puntos oscuros con bordes blancos llamados ocelos, encontrándose el mayor ocelo entre los ojos. El vientre es blanquecino, apenas moteado de gris, y manchado oscuro en el sector de la garganta. *L. latrans* es carnívoro; su dieta consiste en insectos y sus larvas, arácnidos, miriápodos y anélidos [117].

Distribución y hábitat: es una especie tanto diurna como nocturna, son buenos nadadores, pero además pueden caminar y correr sobre la tierra. Se encuentran en pastizales abiertos, estanques, lagunas o zonas inundadas, de la Costa Atlántica, llanuras elevadas y pampas de América del Sur en Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay [4; 11]



**FIGURA 11.** Imagen de *Leptodactylus latrans* o “rana criolla” (Figura modificada de <http://calphotos.berkeley.edu>).

### *Leptodactylus mystacinus* (Burmeister, 1861)

*Leptodactylus mystacinus* (Lm) (Figura 12) es una especie de tamaño moderado, que va desde 44 a 65 mm de SVL en machos adultos, y 54 a 67 mm SVL en hembras adultas. Los dos sexos se pueden distinguir entre ellos por el hocico plano y la falta de asperezas en los pulgares y el pecho de los machos adultos. Esta especie tiene patas traseras relativamente cortas, con puntas de los dedos estrechos y lisos; gran parte de la pierna está cubierta de tubérculos blancos [117].

Como indica la etimología de su nombre (en griego, “mystax” que significa bigote), posee una franja de color claro que recubre el labio superior. La coloración varía entre los individuos, la región dorsal puede ser marrón sólido, rayado o salpicado. La región ventral es por lo general de color claro o moteado con diferentes tonos de marrón. En individuos con vientres moteados, la coloración es más intensa en torno a las inserciones de los brazos.

**Distribución y hábitat:** se encuentra en regiones áridas y subtropicales, en su mayoría en la porción medio este de América del Sur, distribuyéndose desde las montañas Yungas, en el noroeste de Argentina, a las laderas orientales de la Cordillera de los Andes en Bolivia, abarcando Uruguay y Bahía (Brasil). Normalmente habita en los bosques, pero también se han encontrado en claros a lo largo de los bosques atlánticos del centro y sur de Brasil [4; 117].



**FIGURA 12.** Imagen de *Leptodactylus mystacinus* o “rana de bigote” (Figura modificada de <http://calphotos.berkeley.edu>).

### *Leptodactylus chaquensis* (Cei, 1950)

*Leptodactylus chaquensis* (Lc) (Figura 13) es una especie de taxonomía variada y compleja.

Distribución y hábitat: habitan en zonas cercanas a estanques y/o inundadas, ubicándose principalmente en el norte de Argentina (Córdoba, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, Tucumán), región oriental y occidental de Paraguay, el norte de Uruguay y tierras bajas de Bolivia, y en regiones del oeste y sur de Brasil (Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul) [11].

Las especies *L. chaquensis* y *L. latrans* pueden ser consideradas especies hermanas entre sí. Si bien estas especies pueden ser fácilmente identificadas mediante sus llamados de anuncios, también pueden serlo mediante diferencias tales como la coloración dorsal, la cual en Lc es parda mientras que para Ll es amarillenta o verde. Además, la superficie superior de sus muslos es de coloración uniforme verde oscuro en Lc, mientras que en Ll es manchada. Otra característica, es que los machos de Ll presentan una mayor hipertrofia de antebrazos a diferencia de los de Lc [4; 120].



**FIGURA 13.** Imagen de *Leptodactylus chaquensis* (Figura modificada de <http://calphotos.berkeley.edu>).

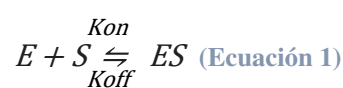
## I.2. Obtención de las secreciones de las pieles de anfibios

Se han empleado diversas metodologías para la extracción de las secreciones de la piel de los anfibios, algunas de ellas invasivas y otras no. Entre las técnicas invasivas se encuentran la inyección de neurotransmisores y la remoción de totalidad de la piel, mientras que entre las menos invasivas esta la estimulación eléctrica transcutánea [20]. El método más antiguo y uno de los más explorados, consiste en la remoción total de la piel del anfibio. Este método tiene como desventaja que se requiere el sacrificio del animal, y las muestras que se obtienen son de una elevada complejidad [20]. Por otro lado, la mayor ventaja radica en una extracción completa de los compuestos contenidos en el interior de las glándulas granulares [62]. La técnica de estimulación eléctrica transcutánea se basa en la aplicación de pequeños estímulos eléctricos sobre la superficie del anfibio, haciendo que estos contraigan la musculatura que rodea a las glándulas granulares y liberen de este modo las secreciones contenidas en ellas [20].

En los últimos años, gracias al avance de las tecnologías de cultivos celulares se ha desarrollado un novedoso método denominado cultivo de microorganismos (MOs), el cual consiste en remover las glándulas granulares de la piel del anfibio y mantenerlas en condiciones vitales en cultivo. De este modo, se pueden coleccionar de manera *in vitro*, en el medio de cultivo las secreciones producidas por las glándulas. Esta metodología, hace que las glándulas actúen a modo de biorreactor, generando una mayor cantidad de secreciones, siendo ampliamente reproducible y duradera en el tiempo. Además de minimizar el número de animales requeridos, hecho que cobra gran importancia al trabajar con especímenes en peligro de extinción [121].

## I.3. Cinética enzimática

Todas las reacciones enzimáticas se inician con la formación de un complejo entre la enzima y su molécula de sustrato (ES). La Formación de este complejo es casi siempre determinada por interacciones no covalentes entre el sitio activo de la enzima (E) y el sustrato (S). Por lo tanto, la reacción representa un equilibrio reversible que puede describirse mediante dos constantes de primer orden: tasa de asociación ( $K_{on}$ ) y tasa de disociación ( $K_{off}$ ).

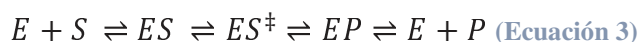


La formación del complejo ES (Ecuación 1) representa un equilibrio termodinámico que es cuantificable en términos de una constante de disociación del

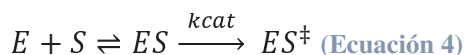
equilibrio,  $K_d$ , o en el caso específico de un complejo enzima-sustrato,  $K_s$ . La constante  $K_s$  es definida como la relación entre la concentración de reactivos y la concentración del producto, y también como la relación entre las constantes de disociación y asociación (Ecuación 2).

$$K_s = K_{off} / K_{on} \text{ (Ecuación 2)}$$

Una vez formado el complejo de encuentro inicial, el sustrato se debe convertir en producto. Esto ocurre a través de la formación de una serie de especies intermedias en las que los componentes del sitio activo interactúan con porciones específicas del sustrato para distorsionar las longitudes y ángulos de unión de manera que dirija la transición del estado intermedio hacia la formación del producto. Como con cualquier reacción química, la formación de las especies intermedias representa la mayor barrera termodinámica para el progreso de la reacción y el paso químico más limitante en la vía de la reacción. Por ejemplo, en una reacción enzimática de un solo sustrato, se puede tener múltiples estados intermedios a lo largo de la vía de reacción entre el complejo ES y el estado final de las enzimas libres y los productos. Como mínimo se debe determinar un complejo que represente el estado de transición límite ( $ES^\ddagger$ ) y un estado que represente el producto final unido a la enzima (EP) (Ecuación 3). Cada uno de estos estados está conectado a su estado anterior y posterior por un conjunto de equilibrios reversibles:



En la práctica, la medición de las constantes individuales o de equilibrio para estos diversos pasos químicos requiere metodologías especializadas, tales como cinética de estado transitorio y/o una variedad de métodos biofísicos para medir equilibrio. Más comúnmente, la tasa de progreso global de la reacción luego de la formación del complejo ES se denomina constante catalítica ( $K_{cat}$ ). Si bien,  $K_{cat}$  es una constante compleja, que representa múltiples estados químicos en la catálisis, está dominada por el paso que limita la velocidad, que más a menudo es la formación del complejo de estado de transición delimitado  $ES^\ddagger$  a partir del complejo de encuentro ES. Así, para una primera aproximación, podemos considerar que  $K_{cat}$  es una constante de primer orden para la transición de ES a  $ES^\ddagger$  (Ecuación 4).

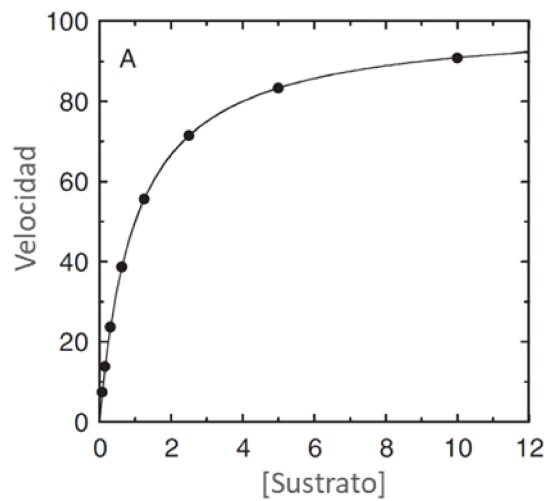


Este modelo, que trata la formación del complejo ES inicial como un equilibrio aislado que es seguido por pasos químicos de catálisis más lentos se denomina "equilibrio rápido". Sin embargo, en la mayoría de los estudios sobre reacciones enzimáticas el modelo de equilibrio rápido no se contempla, en su lugar, la enzima se estudia en condiciones de estado estacionario. Este término se refiere a una situación en la que la concentración del complejo ES se mantiene constante gracias a un equilibrio entre la tasa de formación del mismo (por asociación de la enzima libre y el sustrato libre) y la tasa de desaparición del complejo (a través de la disociación con los reactivos libres y por el progreso hacia la formación de productos). Esto implica que la tasa, o velocidad, de una reacción enzimática (medida como la desaparición del sustrato o la formación de producto) es proporcional a la concentración del complejo ES.

Por lo tanto, mientras la concentración de ES sea constante (es decir, bajo condiciones de estado estacionario), la velocidad de la reacción también será constante, y puede ser definida por la pendiente de una gráfica lineal de la concentración de producto [P] o sustrato [S] en función del tiempo. La condición de estado estacionario se logra experimentalmente al tener un gran exceso molar de sustrato sobre la concentración de enzimas, de modo que exista una cantidad relativamente constante de sustrato disponible para unirse a la enzima libre. Al principio del progreso de la reacción, la cantidad de sustrato que es utilizada por la enzima es una fracción muy pequeña del total de sustrato. Durante esta "fase inicial" de la reacción, las condiciones del estado estacionario se mantienen, y la velocidad inicial ( $v$ ) está definida por la pendiente del producto (o sustrato) en función del tiempo. La fase de velocidad inicial se extiende hasta que un 10 a 15 % de la concentración inicial del sustrato se ha convertido en producto. Luego de esto, la velocidad comienza a disminuir, a medida que el sustrato se agota, hasta que se establezca un equilibrio entre la reacción de formación del producto y la reacción inversa. En la mayoría de las condiciones experimentales y fisiológicas, el equilibrio termodinámico está significativamente a favor de la reacción de transformación del sustrato a los productos.

Si la concentración de la enzima se fija en un valor muy por debajo de la concentración del sustrato, se observa que la variación de la velocidad inicial se da de la siguiente manera: cuando la concentración de sustrato es baja, la velocidad inicial varía linealmente con [S]. En valores intermedios de [S], la velocidad inicial parece ser una función curvilínea de [S], mientras que, a mayores concentraciones de sustrato, la

velocidad inicial parece alcanzar un nivel máximo, como si el sitio activo de todas las moléculas enzimáticas estuviera saturado de sustrato (Figura 14).



**FIGURA 14.** Comportamiento de la velocidad inicial de una reacción enzimática en función de la concentración de sustrato.

Este tipo de comportamiento, sumado a un estado estacionario conduce a la siguiente ecuación matemática para describir la cinética enzimática:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

La Ecuación 5 es conocida universalmente como la ecuación de Michaelis-Menten [122]. El término  $V_{max}$  se refiere a la velocidad máxima obtenida a una concentración infinita de sustrato.  $V_{max}$  es matemáticamente equivalente al producto de  $K_{cat}$  y la concentración de enzima. En el caso de  $K_m$ , este parámetro no es una verdadera constante de equilibrio, sin embargo, puede ser vista como una medida de la afinidad relativa del complejo ES bajo condiciones de estado estacionario. El término cinético  $K_m$  tiene unidades de molaridad, entonces si en la ecuación anterior reemplazamos  $K_m$  por  $[S]$  se observa que este parámetro puede ser definido como la cantidad de sustrato que produce una velocidad igual a la mitad de la velocidad máxima. En otras palabras, la constante  $K_m$  representa la concentración de sustrato que conduce a la saturación de la mitad de los sitios activos de la enzima bajo condiciones de estado estacionario. Los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  se obtienen a partir de la ecuación de la curva de Michaelis-Menten que mejor ajusta los datos obtenidos de velocidad inicial y concentración de sustrato [123].



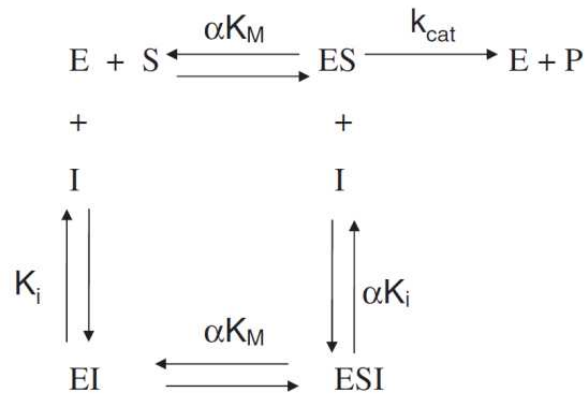
---

## Cinética de la inhibición enzimática

Existen diversos tipos de inhibidores y cada uno tendrá un efecto diferente en la reacción enzimática. En primer lugar, podemos clasificar los inhibidores como reversibles o irreversibles. En la inhibición irreversible la enzima se inactiva al reaccionar con el inhibidor, no sigue una cinética como muestra la Ecuación 5. Normalmente, esta tiene lugar por reacción del inhibidor con los residuos de los aminoácidos del centro activo, originándose complejos enzima-inhibidor altamente estables. En la mayoría de los complejos inactivos la enzima muestra modificación covalente, pero existen casos de unión con enlaces no covalentes muy fuertes, cuya baja disociación los convierte en prácticamente irreversible. El grado de inactivación depende del tiempo de contacto del inhibidor con el resto del sistema [123].

En el caso de los inhibidores reversibles, la interacción con la enzima se da a través de enlaces no covalentes. Se utiliza esta denominación para todos aquellos inhibidores que se pueden separar de la enzima (ya sea por disociación libre o reacción química), y al hacerlo ésta recupera su actividad [124]. En lo que respecta al diseño de fármacos para la EA, se busca que los inhibidores enzimáticos actúen de modo reversible, a fin de poder realizar una modulación de la actividad enzimática, ya que de lo contrario el utilizar inhibidores de tipo irreversible conllevaría en la pérdida total de la funcionalidad normal de las enzimas [125].

En la Figura 15 podemos ver como se ve afectado el progreso de la reacción con la presencia de un inhibidor reversible. El equilibrio entre el complejo binario enzima inhibidor (EI) y las moléculas libres de enzimas e inhibidores está definido por la constante de disociación  $K_i$ . El complejo EI podría unir el sustrato para formar un complejo ESI ternario. Sin embargo, la afinidad del complejo EI por el sustrato puede no ser la misma que la de la enzima libre. Por lo tanto, la constante de disociación  $K_m$  debe ser modificada por la constante  $\alpha$  para describir la unión del sustrato al complejo EI. La constante  $\alpha$  define el grado en que la unión de los inhibidores afecta la afinidad de la enzima por el sustrato. Si la afinidad hacia el sustrato no varía debido a la formación del complejo EI, entonces  $\alpha$  es igual a 1. Si la formación del complejo EI excluye la unión adicional del sustrato, entonces  $\alpha$  tiende a infinito. Finalmente, si la formación del complejo EI aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato,  $\alpha$  toma un valor menor a 1 [123].



**FIGURA 15.** Esquema del equilibrio de una reacción enzimática en presencia y ausencia de un inhibidor reversible.

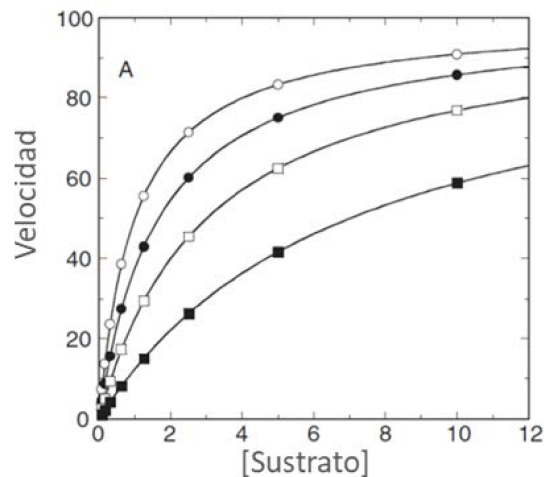
Los inhibidores reversibles pueden clasificarse de acuerdo a los efectos que tienen sobre las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  de la siguiente manera:

### Inhibición competitiva

Un inhibidor que se une exclusivamente a la enzima libre (para el cual se dice que  $\alpha = \infty$ ) es competitivo porque la unión del inhibidor y el sustrato a la enzima son mutuamente excluyentes; de ahí que estos inhibidores compitan con el sustrato por el conjunto de moléculas de enzimas libres. Los inhibidores que se ajustan a este mecanismo afectan el valor aparente de  $K_m$  (que se relaciona con la formación del complejo enzima-sustrato) y la relación  $V_{max}/K_m$ , pero no el valor de  $V_{max}$  (que se relaciona con los pasos químicos posteriores a la formación del complejo ES). La presencia de un inhibidor competitivo influye, por lo tanto, en la ecuación de velocidad de estado estacionario, tal como se describe en la Ecuación 6.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Si se representa la velocidad inicial como una función del sustrato, a concentraciones variables de un inhibidor competitivo, se obtiene un gráfico como el que se muestra en la Figura 16. El valor de  $V_{max}$  es constante en todas las concentraciones de inhibidores, pero el valor aparente de  $K_m$  (definido como  $K_m (1 + [I]/K_i)$ ) aumenta al aumentar la concentración del inhibidor [123].



**FIGURA 16.** Evaluación de la velocidad inicial en función del sustrato en presencia de un inhibidor competitivo en concentraciones variables.

### Inhibición no competitiva

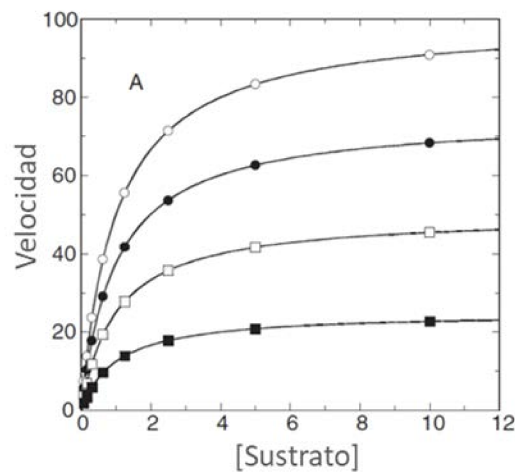
Un inhibidor no competitivo es aquel que muestra una afinidad vinculante tanto para la enzima libre como para el complejo enzima-sustrato o especies subsiguientes. En esta situación la afinidad de unión no puede ser definida por una sola constante de disociación de equilibrio, sino que debemos definir dos constantes de disociación, una para el complejo binario EI ( $K_i$ ) y otra para el complejo ternario ESI ( $\alpha K_i$ ). Cuando la constante  $\alpha$  es igual a la unidad, el inhibidor muestra idéntica afinidad tanto para la enzima libre como para el complejo ES. Cuando  $\alpha$  es mayor a 1, el inhibidor se une preferentemente a la enzima libre, y cuando  $\alpha$  es menor a 1, el inhibidor se une con mayor afinidad al complejo ES.

Este tipo de inhibidores ejerce un efecto cinético sobre el proceso  $E + S \rightarrow ES^\ddagger$ , afectando así el valor de la relación  $V_{max}/K_m$  (influenciados por los términos  $K_i$  y  $\alpha K_i$ ) y el valor de  $V_{max}$  (influenciado por el término  $\alpha K_i$ ). Esto se refleja en la Ecuación 7:

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} [S]}{[S] + K_m \left(\frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}\right)} \quad (\text{Ecuación 7})$$

En otras palabras, el efecto de un inhibidor no competitivo sobre las constantes cinéticas es reducir el valor de  $V_{max}$  y aumentar, disminuir o dejar intacto el valor de  $K_m$ , dependiendo de si  $\alpha$  es mayor, menor o igual a 1, respectivamente. Estos efectos se muestran en la gráfica de velocidad inicial en función de la concentración del sustrato a

concentraciones variables de un inhibidor no competitivo con  $\alpha$  igual a 1 (Figura 17) [123].



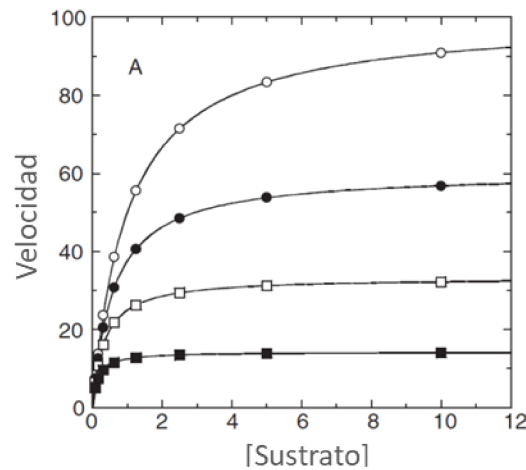
**FIGURA 17.** Evaluación de la velocidad inicial en función del sustrato en presencia de un inhibidor no competitivo ( $\alpha=1$ ) en concentraciones variables.

### Inhibición acompetitiva

Un inhibidor que se une exclusivamente al complejo ES, o a una especie posterior, con poca o ninguna afinidad por la enzima libre se denomina acompetitivo. Los inhibidores de esta modalidad requieren la formación previa del complejo ES para su unión e inhibición. Por lo tanto, estos inhibidores afectan a los pasos de las catálisis posteriores a la unión inicial del sustrato; es decir, afectan al paso  $ES \rightarrow ES^\ddagger$ . Como se ilustra en la Figura 15, la formación del complejo ternario ESI representa un ciclo termodinámico entre los estados ES, EI y ESI. Es por esto que el aumento de la afinidad de un inhibidor acompetitivo que acompaña a la formación del complejo ES debe equilibrarse con un aumento igual de la afinidad del sustrato con el complejo EI. El resultado es que los valores tanto de  $V_{max}$  como de  $K_m$  disminuyen con el aumento de las concentraciones de un inhibidor acompetitivo. La Ecuación 8 representa la velocidad inicial en presencia de un inhibidor de este tipo [123].

$$v = \frac{\frac{v_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} [S]}{[S] + \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Como se mencionó anteriormente, en presencia de un inhibidor acompetitivo, tanto el parámetro de  $V_{max}$  como de  $K_m$  disminuyen en igual proporción, en la Figura 18 se ven representados tales efectos.



**FIGURA 18.** Evaluación de la velocidad inicial en función del sustrato en presencia de un inhibidor acompetitivo en concentraciones variables.

La Tabla 2 resume la información acerca de cada uno de los parámetros afectados respecto del basal para cada tipo de inhibición enzimática previamente descrita.

**TABLA 2.** Información de parámetros  $K_m$  y  $V_{max}$  para la inhibición enzimática reversible

<b>Tipo de Inhibición Reversible</b>	<b><math>K_m</math></b>	<b><math>V_{max}</math></b>
<i>Competitiva</i>	<i>Diferente</i>	<i>Igual</i>
<i>No competitiva</i>	<i>Igual</i>	<i>Diferente</i>
<i>Acompetitiva</i>	<i>Diferente</i>	<i>Diferente</i>

## I.4. Técnicas cromatográficas

### Cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada o TLC (en inglés, *thin layer chromatography*), es una técnica separativa la cual se basa en la diferencia de velocidades de migración de los componentes de la mezcla retenidos en una fase estacionaria y arrastrados por una fase móvil. La fase estacionaria consiste en una delgada y uniforme capa del material adsorbente fijado sobre una superficie sólida, la cual puede ser vidrio, aluminio o plástico.

El tipo de adsorbente utilizado influye en el grado de migración de los componentes de la muestra, los adsorbentes más utilizados son gel de sílice y alúmina, pero se los puede encontrar de diversos tipos. Así mismo, la polaridad de la fase móvil proporciona la fuerza elutora impartiendo a cada uno de los componentes de la muestra diferentes velocidades de migración que permitirán la separación de los mismos.

La TLC comenzó a utilizarse hacia 1950, y continúa siendo aplicada en la actualidad debido a que, es una técnica sencilla de realizar, de bajo costo, sensible y muy eficiente para determinar la pureza e identificar compuestos [126].

### Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (en inglés, *high performance liquid chromatography*), es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en la analítica. Antiguamente se la denominaba cromatografía líquida de alta presión o (en inglés, *high pressure liquid chromatography*) debido a que este tipo de técnica trabaja a elevadas presiones para lograr un mayor grado de resolución, pero en la actualidad esta terminología se considera antigua y está en desuso.

La HPLC es utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Existen un sin número de tipos de técnicas de HPLC, pero la más ampliamente extendida es la de fase reversa (RP-HPLC). La RP-HPLC permite separar moléculas de una muestra en base a su polaridad. En este caso, la fase estacionaria se encuentra formada por partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos de diferentes tipos, saturados, insaturados o aromáticos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. La elución se realiza empleando una mezcla de solventes con diferente grado de polaridad como son el agua, el acetonitrilo, el metanol o el tetrahidrofurano [127].

Para la separación de aminoácidos y péptidos mediante esta técnica, el soporte comúnmente utilizado posee una cadena de 18 carbonos y se la denomina C18 ( $[\text{SiO}_2]-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ ) [128].

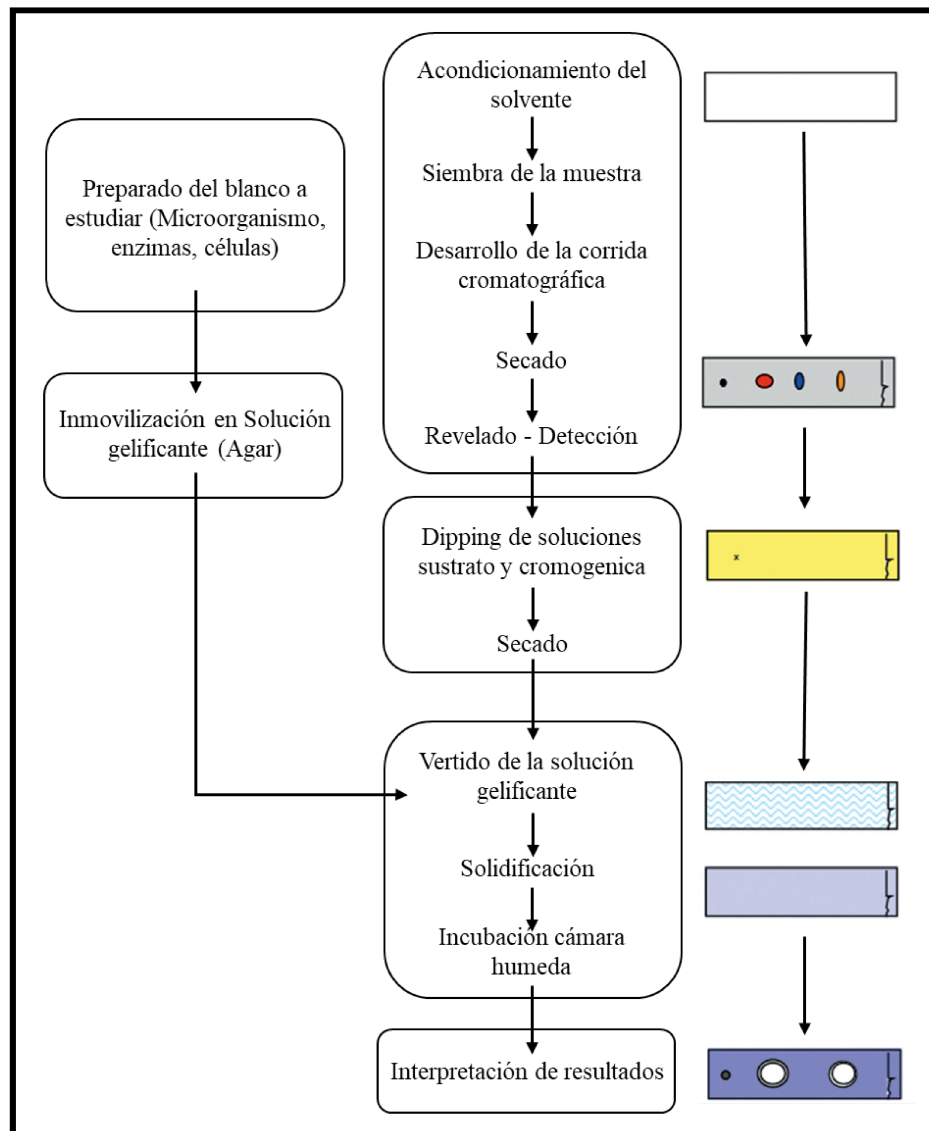
La HPLC puede utilizarse tanto en modo analítico, para evidenciar y/o identificar compuestos, como en modo preparativo, permitiendo separar y purificar cada uno de los constituyentes de una muestra compleja.

## I.5. Bioautografía

La bioautografía es un bioensayo de *screening* que permite la detección de compuestos bioactivos que han sido previamente separados por cromatografía [129]. Esta representa una técnica eficiente, rápida y de bajo costo, la cual ha sido utilizada por más de 60 años. Sin embargo, en el último tiempo la bioautografía ha recibido un gran impulso, debido a nuevos desarrollos, como es la utilización de TLC/HPTLC (en inglés,

*high performance thin layer chromatography*), el cual permite un elevado poder resolutivo de las muestras.

En los comienzos se utilizaba la bioautografía para la detección y aislamiento de compuestos antimicrobianos, pero actualmente se han adaptado los bioensayos para diversas utilidades como ser evaluación de citotoxicidad y búsqueda de inhibidores enzimáticos [130-132].



**FIGURA 19.** Diagrama de los pasos de una bioautografía simple. Representación realizada con PowerPoint.

En la Figura 19 se ejemplifica la metodología. La bioautografía consiste en enfrentar a la muestra compleja previamente separada por cromatografía TLC, a una matriz gelificada la cual posee los blancos a estudiar inmovilizados. Posteriormente, permite observar aquellas zonas donde los compuestos activos reaccionaron. Cabe

destacar, que la bioactividad puede ser puesta de manifiesto por una reacción colorimétrica o por halos de inhibición [133].

## I.6. Espectrometría de masas

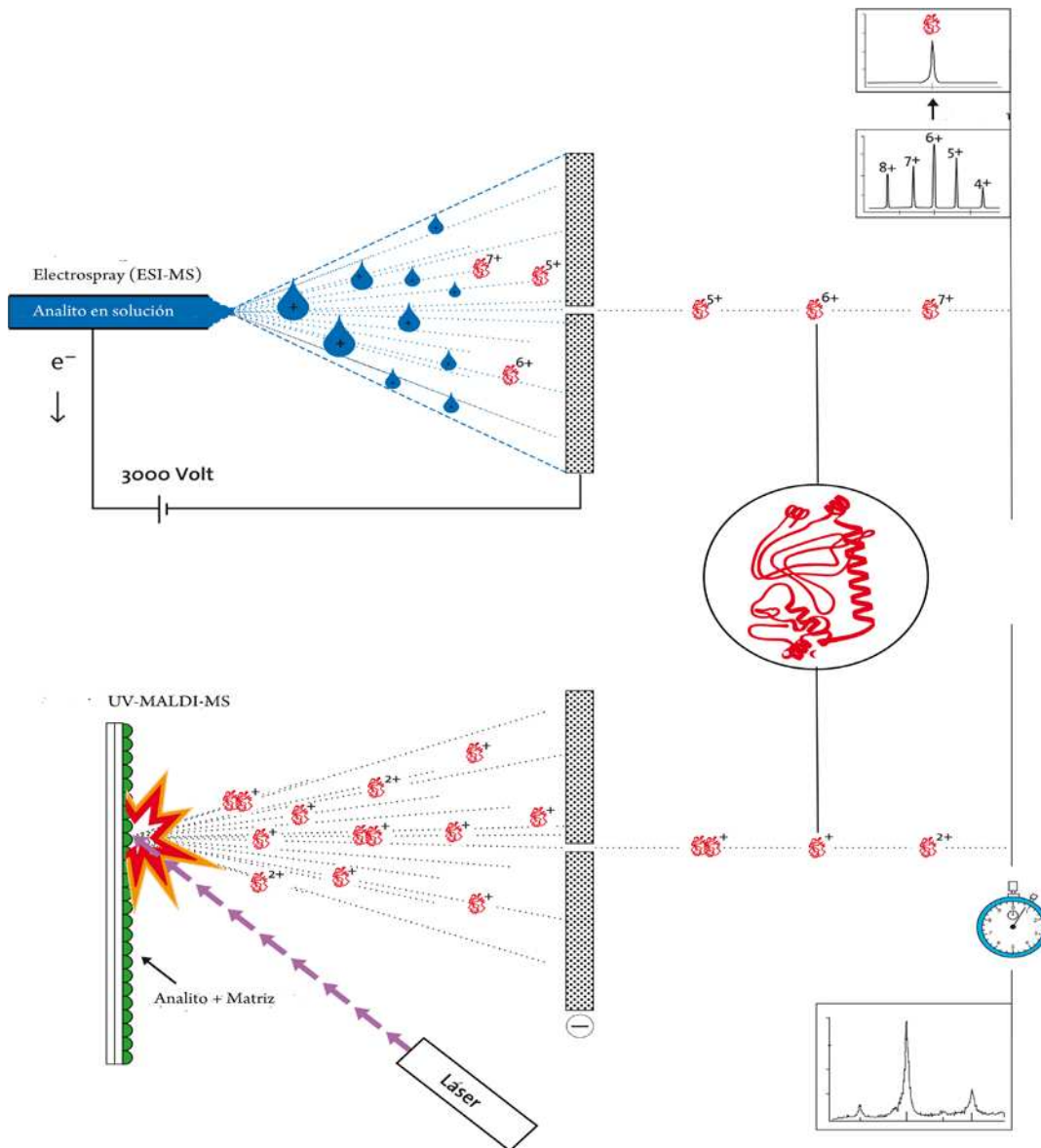
### Espectrometría de Masas Aplicada al Análisis de Polipéptidos

Desde la década del '90 la Espectrometría de Masas (MS) se ha transformado en una técnica analítica indispensable en el campo de la química. En términos generales permite realizar determinaciones estructurales, identificaciones y análisis de trazas. En la actualidad esta técnica constituye una alternativa a la Degradación de Edman para el secuenciamiento de polipéptidos, y a métodos clásicos utilizados para la identificación de modificaciones post-traduccionales. Es posible, estudiar interacciones de tipo covalentes, como por ejemplo uniones antígeno-anticuerpo. Y últimamente se ha utilizado en el área de la medicina para el diagnóstico de enfermedades microbianas. La combinación de la MS con la electroforesis bidimensional y con diferentes técnicas analíticas separativas permite la identificación de proteínas. La miniaturización de la escala de trabajo a nanolitros y a nano-flujo han optimizado esta técnica en lo que se refiere a tiempo y sensibilidad.

A fines de la década del '80 se introdujeron dos métodos suaves para la volatilización / ionización de moléculas termolábiles. En la actualidad podemos decir que estos métodos de ionización, la Ionización por Electrospray (en inglés, *Electrospray ionization* o ESI) y la Desorción/Ionización por láser asistida por matriz (en inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* o MALDI), son complementarias (Figura 20) [134-135].

La ionización por ESI requiere disponer del analito en solución, en un medio polar, introducido en forma de flujo continuo en la región donde se imparte un elevado campo eléctrico. MALDI por su parte, requiere disponer del analito en forma sólida mezclado con un fotosensibilizador (matriz) depositado sobre un electrodo al que se aplicará un campo eléctrico luego de haber sido bombardeado por un láser UV [136-137]. Ambos son suficientemente suaves, de manera que generan iones moleculares gaseosos intactos. Para un analito dado de peso molecular  $m$ , ESI genera una familia de iones moleculares gaseosos policargados ( $m/z$ ; siendo  $m$  el peso molecular, y  $z$  la carga), mientras que MALDI genera preferentemente el ion molecular gaseoso monocargado ( $m/z$ ;  $z=1$ ;  $m/1$ ).





**FIGURA 20.** Esquema representativo de las fuentes de ionización en espectrometría de masas. Ionización por electro spray (ESI) (arriba), y Ionización de Desorción por Laser Asistida por Matriz (MALDI) (abajo).

Por otro lado, una de las ventajas distintivas del ESI es su compatibilidad online con técnicas separativas. Es decir, este concede la posibilidad de acoplarse a métodos separativos como son HPLC o nano-HPLC, permitiendo una separación previa de una muestra compleja que será analizada en el espectrómetro de masas.

### Analizadores de Masas

Todos los espectrómetros de masas combinan la formación de iones, el análisis de masas, y la detección de estos iones.

A la salida de la fuente de ionización, se genera una gran diversidad de iones, los cuales deben ser separados para realizar los análisis correspondientes. Los analizadores de masas llevan a cabo esta separación por diferentes métodos, de acuerdo a su relación  $m/z$  para que puedan llegar al detector. Hay una gran variedad de analizadores de masas disponibles, incluyendo cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo (en inglés, *time of flight* o Tof), sector magnético, ciclotrón, entre otros. Cada tipo de analizador posee características y aplicaciones especiales, así como beneficios y limitaciones. La selección del tipo de analizador a utilizar es en base a que aplicación se le dará, el costo y el rendimiento [138-139].

### **Analizador de Tiempo de Vuelo (Tof)**

El principio de operación del analizador de tiempo de vuelo (Tof) involucra la medición del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de iones hasta el detector localizado a 1-2 m de la fuente. Todos los iones reciben la misma energía cinética durante la aceleración instantánea (3000 eV), pero debido a que tienen diferentes valores de  $m/z$ , se separan en grupos de acuerdo a la velocidad con la que van recorriendo la región libre de campo entre la fuente de iones y el detector. Los iones chocan secuencialmente en el detector en forma de un incremento de  $m/z$ ., es decir, aquellos iones de baja  $m/z$  llegan al detector antes que aquellos con  $m/z$  alta, de esta forma cuanto mayor sea la relación de  $m/z$  menor será la velocidad que tendrán [140].

# CAPÍTULO I

## Objetivos

Aislamiento, caracterización y  
purificación de extractos de  
pieles de anfibios

Lic. Roque Spinelli

## I: OBJETIVOS

### GENERALES

- Evaluar la potencialidad de extractos de pieles de anfibios como fuentes de péptidos con actividad biológica frente a blancos terapéuticos de la Enfermedad de Alzheimer.

### ESPECÍFICOS

- Realizar la obtención de los extractos peptídicos de las pieles de anfibios pertenecientes a las familias Hylidae y Leptodactylidae del Litoral Argentino.
- Llevar a cabo una caracterización analítica de los extractos de las pieles de anfibios.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos frente a las enzimas colinesterasas (AChE y BChE):
  - i. Investigar la inhibición mediante ensayos *in vitro* de punto final.
  - ii. Poner a punto y aplicar la metodología de bioautografía para la detección de principios activos en las pieles.
  - iii. Realizar estudios cinéticos de inhibición a modo de conocer el mecanismo de acción de los inhibidores.
- Avanzar en el conocimiento de la actividad multimoduladora de los extractos mediante estudios de la inhibición de la enzima MAO-B.
- Estudiar la capacidad neuroprotectora de los extractos mediante la determinación de la actividad antioxidante y quelante.
- Llevar a cabo estudios de toxicidad de los extractos frente a glóbulos rojos humanos y líneas celulares.

# CAPÍTULO I

## Materiales y Métodos

Aislamiento, caracterización y  
purificación de extractos de  
pieles de anfibios

Lic. Roque Spinelli

## I: MATERIALES Y MÉTODOS

### I.1. Fuente del material biológico

#### Muestreo de los anfibios

Especímenes adultos de anfibios anuros fueron recolectados manualmente, intensificándose las búsquedas durante los meses de primavera y verano, debido a que en estas estaciones la actividad de los anfibios se ve incrementada. Las colectas fueron llevadas a cabo durante el período 2016-2018, en zonas rurales de la ciudad de San José de Rincón de la Provincia de Santa Fe y en el pueblo de Mina Clavero de la Provincia de Córdoba, todas perteneciente a la República Argentina (\*).

La manipulación de los anfibios se realizó siguiendo la normativa internacional vigente de buenas prácticas en el manejo de animales “Guía para el uso de anfibios y reptiles vivos en el campo de la investigación en laboratorio” de la *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* (ASIH) [141] (\*).

#### Metodologías de obtención de los extractos

Todos los especímenes de anfibios primeramente fueron rociados con agua Milli-Q a modo de retirar cualquier suciedad que pudiera interferir con los análisis posteriores.

#### Extracción con solventes (ES)

Los ejemplares de cada especie se eutanizaron siguiendo los protocolos avalados por las normativas internacionales de la ASIH [141]. Posteriormente, se removió la piel y se la conservó en etanol a 4 °C hasta el momento de su procesamiento. A tales efectos, las pieles fueron trituradas mediante la utilización de un homogeneizador Ultra-Turrax T25, y colocadas en solución alcohólica al 60 %. El proceso extractivo se realizó en vasos de precipitado de boca ancha a pH 3-4 con ácido acético, la agitación se realizó por un período de 2 hs a 0 °C, para evitar de este modo la acción de las enzimas proteolíticas presentes en las pieles [62].

---

(\*) Las colectas y manipulación de los especímenes se realizaron bajo la supervisión de los biólogos Dr. Andrés M. Attademo (Cátedra de Ecotoxicología – ESS-FBCB-UNL) y el Dr. Javier A. López (INALI – CONICET), los cuales cuentan con los permisos de colecta y estudios de anfibios anuros con fines científicos, gestionados en la secretaría de Estado y Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable – Área Fauna.

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 10000 rpm, a bajas temperaturas. El proceso se repitió tres veces.

Las secreciones obtenidas fueron concentradas en evaporador rotatorio (Buchi RE-121), liofilizadas y conservadas a -18 °C hasta su utilización.

## I.2. Análisis cromatográficos

### Cromatografía en capa delgada (TLC)

Los extractos se analizaron por cromatografía en capa delgada TLC. Para ello, los extractos se disolvieron en agua Milli-Q y se sembraron en placas de TLC (Merk - sílica gel 60 F<sub>254</sub>). Como mezcla de corrida se utilizó n-butanol: ácido acético: agua (55,6: 22,2: 22,2).

El revelado de las placas se llevó a cabo mediante el ensayo de ninhidrina, el reactivo de Dragendorff, y con luz UV a 254 y 365 nm.

El test de Kaiser o ninhidrina es un test altamente sensible utilizado para la detección de aminas primarias, por lo cual es ampliamente utilizado para evidenciar la presencia de aminoácidos, péptidos o proteínas. Una reacción de ninhidrina positiva es puesta de manifiesto mediante la aparición de una coloración azul violácea intensa [142].

El reactivo de Dragendorff es una reacción característica para evidenciar la presencia de alcaloides mediante la formación de un precipitado color naranja [143].

### Cromatografía Líquida de Alta Performance en fase reversa (RP-HPLC)

Los extractos completos de las pieles obtenidos mediante el método de extracción con solventes (ES), fueron analizados por HPLC en fase reversa, bajo idénticas condiciones experimentales con el fin de establecer comparativas en sus perfiles cromatográficos.

Para ello, se disolvieron los extractos en agua Milli-Q conteniendo unas gotas de metanol, mediante agitación con vortex y sonicación. Las soluciones fueron mantenidas en estufa a 40 °C hasta el momento de la inyección, a modo de evitar la formación de agregados. Luego, las soluciones fueron filtradas con la utilización de membranas de 0,45 µm (Millipore).

Se trabajó con un equipo Waters 1525 (USA) y una columna Atlantis C18 (Waters) de 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 4,6 x 150 mm. Se empleó un sistema binario de solventes: Solvente A: agua Milli-Q con 0,1 % de TFA, y Solvente B: acetonitrilo (ACN) con 0,08 % de ácido trifluoroacético (TFA). La detección se realizó con un detector Waters 2489 (USA) a 220 y 280 nm. El gradiente de elusión utilizado fue de 5 % de ACN durante 5 min, del 5 al 80 % hasta los 30 min, y finalmente, se mantuvo al 80 % durante 3 min; a un flujo de 0,8 ml/min. El gradiente de elusión fue escogido luego de varias pruebas, tomando como criterio la mejor resolución cromatográfica obtenida.

### I.3. Análisis mediante electroforesis en gel

#### Geles de Tricina SDS-PAGE

Se realizó el análisis electroforético mediante geles discontinuos de Tricina SDS-PAGE (en inglés, *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). Se utilizaron geles de stacking al 1 % y de separación al 16 %, en condiciones reductoras, siguiendo la metodología descrita por Schägger [144]. 10 mg/ml de los extractos previamente incubados junto con  $\beta$ -mercaptoetanol a 100 °C durante 5 min, fueron sembrados en los geles. Las condiciones de corrida fueron de 30 V hasta pasar el stacking y 100 V durante 8 h. La corrida electroforética fue realizada a 4 °C para evitar la desgelificación producto del alto voltaje. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular entre 1 a 80 kDa. Para la visualización de las bandas se utilizó una tinción de plata debido a su alta sensibilidad de detección [145].

### I.4. Cuantificación de proteínas y péptidos

#### Método del ácido bicinconínico (BCA)

El ensayo del BCA [146] se basa principalmente en dos reacciones acopladas. En primer lugar, los enlaces peptídicos reducen los iones  $\text{Cu}^{+2}$  del sulfato cúprico a  $\text{Cu}^{+1}$ . A continuación, dos moléculas de BCA quelan un ion  $\text{Cu}^{+1}$  formando un complejo de color púrpura, con un máximo de absorbancia a 562 nm.

Para realizar las determinaciones se reconstituyeron los extractos en agua Milli-Q; 100  $\mu\text{l}$  de los mismos fueron incubados, junto a 2 ml de reactivo estándar de trabajo (conteniendo BCA, tartrato de sodio, y sulfato de cobre en medio básico) a 60 °C durante 30 min. Se enfrió y se determinó la absorbancia a 562 nm. Una curva de albumina fue utilizada como estándar.



---

## I.5. Espectrometría de masas

### Análisis por Maldi-Tof

Los pesos moleculares de los compuestos constituyentes de los extractos se analizaron mediante el empleo de un equipo MALDI-Tof-Tof Abi Sciex 4800.

Las muestras fueron disueltas en agua Milli-Q conteniendo 0,1 % de TFA. Posteriormente, fueron desaladas tres veces con la utilización de tips PolyLC C18 con agua; luego se realizó la elución con ACN: TFA (70: 0,1 %). Se colocaron las muestras en las placas de MALDI, y se agregó la matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en ACN: TFA (50: 0,1 %).

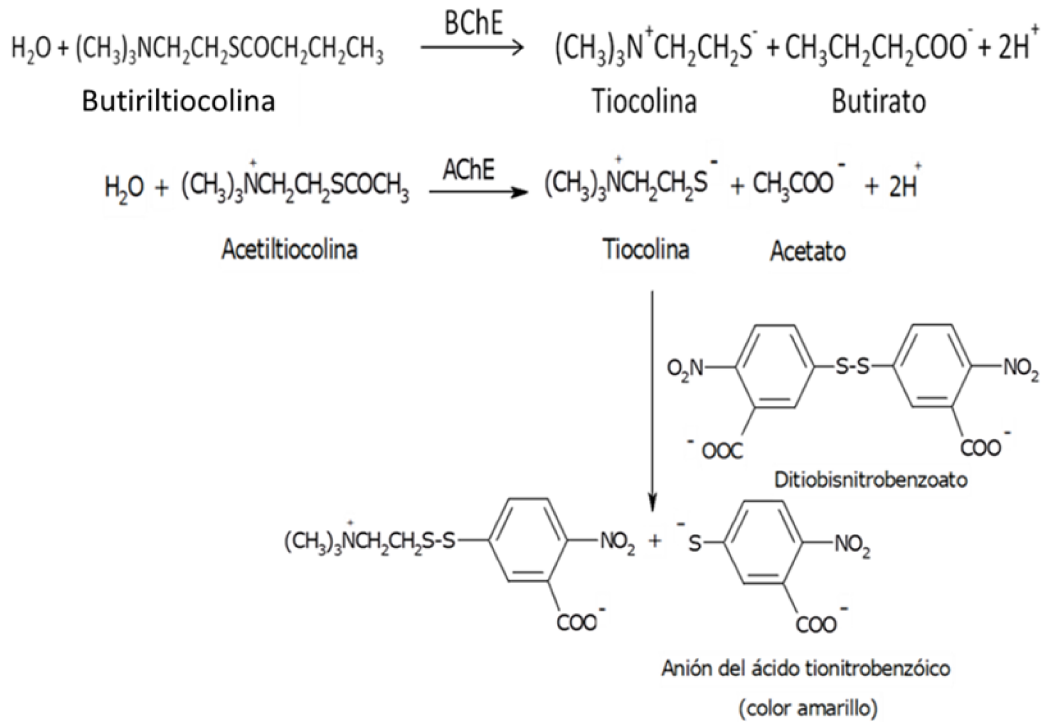
Las determinaciones fueron realizadas en el modo de adquisición de datos MS reflector positivo, en el rango de 600-4200 m/z, con un poder de laser de 4200.

Los estudios de Espectrometría de masas MALDI-Tof fueron llevados a cabo en colaboración con la Unidad de Proteómica y Bioquímica Analítica del Instituto Pasteur – Montevideo bajo la dirección de la Prof. Msc. Madelon Portela.

## I.6. Determinación de la actividad biológica

### I.6.1. Actividad enzimática de las colinesterasas

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de la AChE y BChE, se utilizó un micrométodo basado en el ensayo de Ellman con pequeñas modificaciones [147]. El principio de esta metodología se basa en la determinación de la cantidad de tiocolina producida por la hidrólisis enzimática por parte de las colinesterasas del sustrato acetilcolina o butiriltiocolina. Esto es logrado por la reacción continua de la tiocolina con el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) para producir el anión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico de color amarillo. En fundamento de la determinación enzimática de la metodología de Ellman se esquematiza en la Figura 21.



**FIGURA 21.** Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico de Ellman para determinar la actividad enzimática de las colinesterasas. Representación realizada con ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

### Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)

Para el ensayo de inhibición de AChE, la enzima acetilcolinesterasa comercial tipo VI-S, obtenida de *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica) (Sigma-Aldrich), fue diluida en buffer fosfato a pH=7,5 hasta lograr una concentración de 0,25 U/ml. Como sustrato se utilizó yoduro de acetiltiocolina (0,24 mM) y como reactivo de color DTNB (0,2 mM), los cuales fueron disueltos en Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,04 mM) y el pH se ajustó a 7,5. Todos los reactivos utilizados fueron marca Sigma.

Las muestras fueron disueltas en buffer fosfato pH=7,5. En una placa de 96 pocillos, se incubaron 50 µl de la solución enzimática junto a 50 µl de concentraciones crecientes finales de 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 µg/ml de los extractos, durante 30 min a 25 °C. Posteriormente se añadió 100 µL de la solución de sustrato y DTNB. La absorbancia del color amarillo a los 5 min del inicio de la reacción fue determinada a 405 nm en un lector de microplacas Thermo Multiskan FC (Thermo Scientific). Como control positivo se utilizó Rivastigmina [90].

### Actividad inhibitoria de la enzima butirilcolinesterasa (BChE)

Para la determinación de la actividad inhibitoria de la BChE se utilizó la metodología de Ellman y col. anteriormente mencionada, con modificación de la enzima y sustrato utilizados. La enzima utilizada fue la BChE obtenida a partir de suero humano, y el yoduro de S-butirilcolina (BTCI) (7 mM) como sustrato. La absorbancia del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico a 405 nm de igual modo que lo mencionado para la AChE fue determinada. Como control positivo de inhibición se utilizó la Rivastigmina. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado y en casos necesarios se realizaron replicas.

A ambas enzimas se les calculó el porcentaje de inhibición (% I) como:

$$\% I = 1 - \left( \frac{AbsM - AbsB}{AbsBa - AbsB} \right) \times 100 \text{ (Ecuación 9)}$$

donde AbsM, AbsB, y AbsBa representan la absorbancia de la muestra, absorbancia del blanco y absorbancia del basal, respectivamente (Ecuación 9). La concentración a la cual se produce el 50 % de la inhibición de la actividad enzimática (IC50) fue calculada con los datos del % I obtenidos.

### Bioautografía

Se utilizó el ensayo de bioautografía como método de *screening* de la actividad inhibitoria de los extractos, siguiendo la metodología descrita por Ramallo y col. [131].

Brevemente, agar noble al 1 % P/V fue disuelto a 80 °C en buffer Tris-HCl (50 mM, pH = 7,8). Posteriormente la solución fue enfriada a 50 °C y se agregó una solución de AChE (tipo VI-S, de *E. electricus*) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 60 U/ml.

Por otro lado, los extractos fueron desarrollados en una placa de cromatografía en capa delgada (TLC) (Merk - silica gel 60 F<sub>254</sub>) de 50 cm<sup>2</sup>, utilizándose como mezcla de corrida n-butanol: ácido acético: agua (55,6: 22,2: 22,2). La placa de TLC fue embebida en una solución de  $\alpha$ -naftil acetato (6,70 mM) y Fast Blue B (2,60 mM). Esta se dejó secar a temperatura ambiente, y seguidamente la solución de agar-AChE fue distribuida sobre la placa de TLC. Una vez gelificada, la placa fue incubada a 37 °C por 20 min en ausencia de luz.

Para BChE se procedió de igual modo que lo descrito anteriormente, con la única modificación de la enzima a utilizar. La BChE fue obtenida a partir de suero humano.

Para corroborar la eficiencia de la bioautografía, se utilizó como control positivo de inhibición una solución de cafeína, tanto para AChE como para BChE [131].

La presencia de halos blancos sobre la matriz violeta indicó la presencia de compuestos bioactivos. La detección de falsos positivos fue realizada con  $\alpha$ -naftol.

Los valores de Rf fueron calculados según la Ecuación 10:

$$Rf = D_c / D_s \text{ (Ecuación 10)}$$

representando Dc y Ds la distancia recorrida por los compuestos y la distancia de migración del frente de solvente en la placa de TLC, respectivamente (Ecuación 10).

### Determinación de la cinética enzimática de las colinesterasas (AChE y BChE)

Los ensayos cinéticos para AChE y BChE fueron realizados siguiendo la metodología de Ellman [147]. Para ello, 50  $\mu$ l de concentraciones crecientes de extractos (50, 100, 200, 400, y 800  $\mu$ g/ml) se incubaron junto a 50  $\mu$ l de cada enzima, AChE de *E. electricus* (Sigma-Aldrich) (0.25 U/ml) y BChE obtenida a partir de suero humano, en buffer fosfato (pH 7,5) a 25 °C por 30 min. Luego concentraciones crecientes de los sustratos fueron agregadas (0,03 a 0,94 mM de ATCI y 0,05 a 1,70 mM de BTCl) junto con una solución 0,2 mM de DTNB.

La cinética fue determinada a través de 75 lecturas a 405 nm durante un período de 2,28 min. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 7. Los parámetros cinéticos (Km y Vmax) en presencia y ausencia de extractos fueron determinados mediante curvas de Michaelis-Menten. Además, se evaluó el tipo de inhibición producido, y este fue determinado mediante la comparación de los parámetros cinéticos (Km y Vmax), en presencia y ausencia de los inhibidores, aplicando el test de ANOVA de una vía y analizando su P valor.

### I.6.2. Actividad inhibitoria de la monoamino oxidasa B (MAO-B)

La enzima MAO-B fue obtenida a partir de la fracción mitocondrial de cerebros ratas Wistar. Dichos cerebros fueron proveídos por la cátedra de Fisiología Humana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral.

Los cerebros de 2 ratas fueron lavados con buffer de extracción: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13,2 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (53,5 mM), sacarosa (113,6 mM) y citrato de sodio (20 mM) a fin de

retirar restos de sangre y tejidos. Posteriormente, se procedió con la trituración de los cerebros de manera manual, utilizando un homogeneizador de vidrio y teflón, con el agregado de una proporción de 10 ml de buffer de extracción por gramo de cerebro. El homogeneizado fue centrifugado a 1000 G a 4 °C por 5 min y el sobrenadante fue recolectado, dicho proceso fue reiterado dos veces. Finalmente, los homogeneizados fueron centrifugados a 13000 G a 4 °C por 10 min, obteniéndose en el precipitado las fracciones mitocondriales con presencia de la enzima MAO-B [148].

El potencial inhibitorio de los extractos contra la enzima MAO-B, fue determinado siguiendo la metodología descrita por Soto-Otero y col., con pequeñas modificaciones [148]. Para ello, 20 µl de concentraciones crecientes (50, 100, 200, 400 y 800 µg/ml) de los extractos en buffer fosfato fueron colocadas junto a 45 µl del purificado de MAO-B e incubados durante 30 min a 30 °C. Para evidenciar la actividad enzimática se utilizó una determinación indirecta a través de la enzima Horse Radish Peroxidase (HRP). 10 µl de HRP (5 U/ml), 20 µl de una solución de benzilamina (20 mM) y 20 µl de una solución de o-dianisidina (5mM) fueron agregados, y se incubaron a 30 °C por 60 min. Todos los reactivos y enzimas utilizadas fueron provistas por Sigma-Aldrich. La absorbancia del producto coloreado fue determinada a 405 nm utilizando un lector de multiplacas Thermo multiskan FC (Thermo Scientific).

Se calculó el porcentaje de inhibición (% I) según la Ecuación 11:

$$\%I = 1 - \left( \frac{AbsM - AbsB}{AbsBa - AbsB} \right) \times 100 \text{ (Ecuación 11)}$$

donde AbsM, AbsB, y AbsBa representan la absorbancia de la muestra, absorbancia del blanco y absorbancia del basal, respectivamente. La Selegilina fue utilizada como control positivo [106]. La IC50 fue calculada con los datos del % I obtenidos.

### I.6.3. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada mediante el método de la captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrylhydrazilo (DPPH), acorde a los ensayos descritos por Memarpoor-Yazdi con menores modificaciones [149]. 50 µl de concentraciones crecientes de extractos (100, 200, 400 y 800 µg/ml), fueron mezcladas con 50 µl del radical DPPH (0,15 mM en metanol), y llevado a volumen con 150 µl de metanol. La mezcla fue incubada en oscuridad por 30 min.

El basal de actividad fue determinado utilizando 200 µl de metanol junto a 50 µl del radical DPPH. Como control positivo de actividad se utilizó ácido ascórbico, el cual es un reportado agente antioxidante [150]. El radical libre DPPH fue provisto por Sigma-Aldrich, mientras que el metanol fue Cicarelli.

La absorbancia resultante de la actividad fue determinada a 517 nm mediante un lector de microplacas Thermo Multiskan FC (Thermo Scientific).

El porcentaje de captura del radical libre DPPH (% RSA) y la EC50 (concentración efectiva del compuesto que reduce la concentración inicial del DPPH al 50 %) fueron determinados. El % RSA se calculó según la Ecuación 12:

$$\% RSA = 1 - \left( \frac{AbsM}{AbsBa} \right) \times 100 \text{ (Ecuación 12)}$$

representando AbsM y AbsBa los valores de absorbancia de la muestra y del control basal, respectivamente.

#### I.6.4. Actividad quelante del hierro

La actividad quelante del ion  $Fe^{2+}$  fue determinada mediante el método descrito por He y col. [151] con pequeñas modificaciones.

Para ello, 50 µl de concentraciones crecientes de los extractos (100, 200, 400, 800 y 1600 µg/ml), fueron pre incubadas con 5 µl de una solución de Sulfato ferroso 2 mM, seguido del agregado de 185 µl de agua Milli-Q. Posteriormente se agregó 10 µl de una solución comercial de Ferrozina 5 mM, y se incubó a 25°C durante 10 minutos.

La absorbancia fue determinada a 562 nm, y el porcentaje de la actividad quelante del hierro (II) fue calculada en base a la Ecuación 13:

$$\% \text{ Actividad Quelante} = 1 - \left( \frac{AbsM}{AbsC} \right) \times 100 \text{ (Ecuación 13)}$$

siendo AbsM y AbsC, las absorbancias de la muestra y del control respectivamente. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fue utilizado como control positivo.

## I.7. Evaluaciones toxicológicas

### Evaluación de la actividad hemolítica

Se ensayo la actividad lítica de las muestras sobre eritrocitos humanos sanos, utilizando protocolos previamente optimizados por el grupo de trabajo [152]. Los glóbulos rojos humanos (GRh) [Grupo 0, Rh (+)] obtenidos a partir de un pool de sangre fresca fueron lavados tres veces con solución fisiológica comercial y se separaron por centrifugación. Una suspensión de 0,4 % de los GRh en solución fisiológica fue preparada.

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en solución fisiológica comercial y se realizaron diluciones seriadas. A 100 µl de cada muestra se le adicionaron 200 µl de la suspensión de GRh, y posteriormente fueron incubadas durante una hora a 37 °C. Luego, se procedió a centrifugarlas a 3000 RPM, y 200 µl del sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 pocillos. La cantidad de hemoglobina liberada fue determinada a través de su absorbancia a 405 nm. Un blanco y un control positivo (100 % de hemólisis) de reacción fueron realizados con solución fisiológica y Tritón al 0,1 %, respectivamente.

El porcentaje de hemólisis fue determinado mediante el siguiente calculo como:

$$\% \text{ Hemólisis} = 1 - \left( \frac{\text{AbsM} - \text{AbsSf}}{\text{AbsT} - \text{AbsSf}} \right) \times 100 \text{ (Ecuación 14)}$$

donde AbsM, AbsSf y AbsT representan la absorbancia de la muestra, la absorbancia al 0 % de hemólisis con solución fisiológica comercial, y la absorbancia al 100 % de hemólisis con Tritón, respectivamente (Ecuación 14). Finalmente, valores de HC50 (concentración a la cual se produce el 50 % de la actividad hemolítica) de las muestras fueron calculados.

### Citotoxicidad frente a células de mamíferos

#### Cultivo celular

La línea celular de ovario de hamster chino K1 (CHO-K1) fue obtenida del banco celular ATCC (CCL-61) y mantenida en medio RPMI 1640 suplementado con, 10 % de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomycin. Las células fueron incubadas a 37 °C y al 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosfera humidificada. El seguimiento del desarrollo celular se realizó en microscopio invertido (Leica DMi1).

### Citotoxicidad frente a células CHO-K1

La citotoxicidad fue determinada mediante el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células fueron colocadas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^4$  células por pocillo. Luego de 24 h de incubación en las condiciones previamente descriptas, las muestras fueron agregadas en concentraciones crecientes. 24 h posteriores, el medio de cultivo fue retirado y se adicionó 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo, y las placas fueron nuevamente incubadas durante 4 h a 37 °C. Los cristales de formazan producidos, fueron disueltos con el agregado de 100  $\mu$ l de dimetilsulfoxido (DMSO) en cada pocillo [121]. Una solución de Doxorubicina se utilizó como control positivo (0 % de viabilidad celular) y medio de cultivo RPMI 1640 como basal (100 % de viabilidad). La absorbancia fue determinada a 495 nm, y el porcentaje de viabilidad fue calculado como:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = 1 - \left( \frac{AbsM}{AbsBa} \right) \times 100 \text{ (Ecuación 15)}$$

siendo AbsM y AbsBa la absorbancia de la muestra y del basal, respectivamente (Ecuación 15).

Finalmente, valores de IC<sub>50</sub> de las muestras fueron calculadas como la concentración a la cual las muestras causan el 50 % de viabilidad celular. Los ensayos fueron realizados por triplicado y en dos replicas independientes.

### I.8. Análisis de datos

El análisis de los datos para el cálculo de las bioactividades fue llevado a cabo a través del software R [153]. En todos los casos se establecieron intervalos de confianza del 95 %. Por otro lado, para la creación de las curvas de dosis respuesta, para el cálculo de los IC<sub>50</sub> se utilizó el paquete GRmetrics [154] del proyecto Bioconductor [155]. Los gráficos fueron creados con el paquete ggplot2 [156].



# CAPÍTULO I

## Resultados y Discusiones

Aislamiento, caracterización y  
purificación de extractos de  
pieles de anfibios

Lic. Roque Spinelli

## I: RESULTADOS Y DISCUSIONES

### I.1. Muestreo de los anfibios

Se estudiaron extractos de pieles de anfibios pertenecientes a dos familias del Litoral Argentino:

- Familia Hylidae: *Boana cordobae* y *Pseudis minuta*.
- Familia Leptodactylidae: *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus chaquensis* y *Leptodactylus mystacinus*.

Durante los meses de verano y primavera del período 2016-2017, con posterioridad a precipitaciones, especímenes adultos de cada especie fueron colectados.

En la Tabla 3 se presenta información respecto las regiones geográficas de colecta de las especies, así como el número total de especímenes utilizados, su longitud hocico-cloaca (SVL).

Cabe mencionar que las cinco especies estudiadas se encuentran dentro de la categoría especie bajo preocupación menor o *Least concern species*. Una especie se considera bajo preocupación menor cuando, tras ser evaluada por la *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), no cumple ninguno de los criterios de las categorías en peligro, en peligro crítico, vulnerable o casi amenazado de la Lista Roja elaborada por dicha organización [157].

### I.2. Caracterización analítica

Las pieles de los anfibios representan una importante fuente de compuestos con amplia actividad biológica, siendo los péptidos las moléculas más abundantes y de mayor bioactividad [17]. Puesto a que el objetivo de esta tesis se enfocó en la búsqueda de péptidos bioactivos en extractos de pieles de anfibios, una caracterización analítica enfocada a evidenciar la presencia de estos fue llevada a cabo.

TABLA 3. Información acerca de la colección de especímenes de anfibios.

Especies	Acrónimo	Nº especímenes <sup>(a)</sup>	Año de colecta	Fuente	SVL (mm) <sup>(b)</sup>
<i>B. cordobae</i>	Bc	4	2016	Cordoba, (Cordoba) (30°51'47''S / 64°29'36''O)	37-50
<i>P. minuta</i>	Pm	5	2017	San José del Rincon, (Santa Fe) (31°36'21''S / 60°36'29''O)	45-65
<i>L. latrans</i>	Ll	3	2017	San José del Rincon, (Santa Fe) (31°36'17''S / 60°36'28''O)	80-120
<i>L. chaquensis</i>	Lc	4	2017	San José del Rincon, (Santa Fe) (31°36'25''S / 60°36'33''O)	21-23
<i>L. mystacinus</i>	Lm	4	2017	San José del Rincon, (Santa Fe) (31°36'12''S / 60°36'18''O)	43-55

<sup>(a)</sup> Número total de especímenes utilizados para la extracción de muestras biológicas. <sup>(b)</sup> SVL: longitud hocico-cloaca.

---

## Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas de los extractos fue determinado mediante el método del ácido bicinconínico. En este, el dosaje de proteínas ocurre a través de la cuantificación indirecta de la reducción del ion  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por parte de los enlaces peptídicos [146]. Este método permite expresar el porcentaje de proteínas presente por cada gramo de extracto.

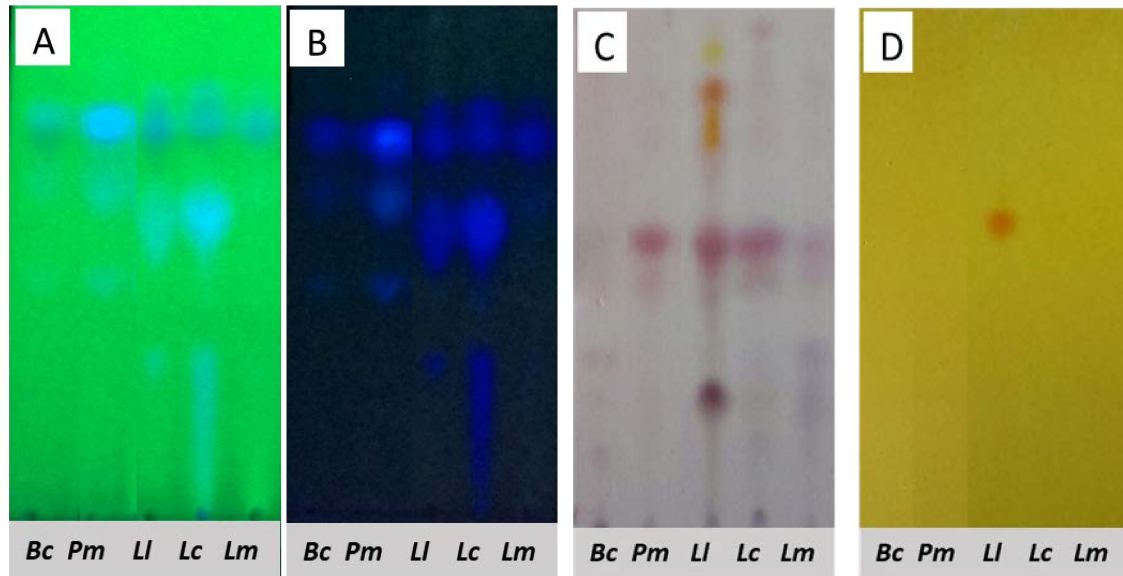
Como resultado se obtuvo que los extractos de la familia Hylidae fueron de un mayor contenido proteico que los de la familia Leptodactylidae. La familia Hylidae presentó porcentajes de proteína del 64,00 % para *B. cordobae* y 41,18 % para *P. minuta*. Mientras que los porcentajes para los extractos de la familia Leptodactylidae fueron del 39,22; 27,60 y 17,25 %, para *L. latrans*, *L. mystacinus* y *L. chaquensis*, respectivamente.

## Análisis mediante cromatografía en capa delgada (TLC)

La Figura 22 muestra los resultados de los estudios mediante cromatografía en capa delgada TLC. El análisis a 254 y 365 nm de los extractos por cromatografía en capa delgada TLC (Figuras 22 A-B) permitió evidenciar la compleja composición de estos y cuan variable es la polaridad de los compuestos que los constituyen.

Se observó en los extractos de las cinco especies estudiadas la presencia de compuestos de naturaleza peptídica que reaccionaron positivamente con el reactivo de ninhidrina, siendo mayor en la familia Leptodactylidae (Figura 22 C).

Por otro lado, el revelado mediante Dragendorff no evidenció la presencia de alcaloides en los extractos ensayados, con excepción del de *L. latrans* el cual mostró un spot reactivo para alcaloides (Figura 22 D).



**FIGURA 22.** Estudio de los extractos de las familias Hylidae y Leptodactylidae mediante cromatografía en capa delgada (TLC). Revelado a 254 nm(A), 365 nm(B), reactivo de ninhidrina(C) y reactivo de Dragendorff(D).

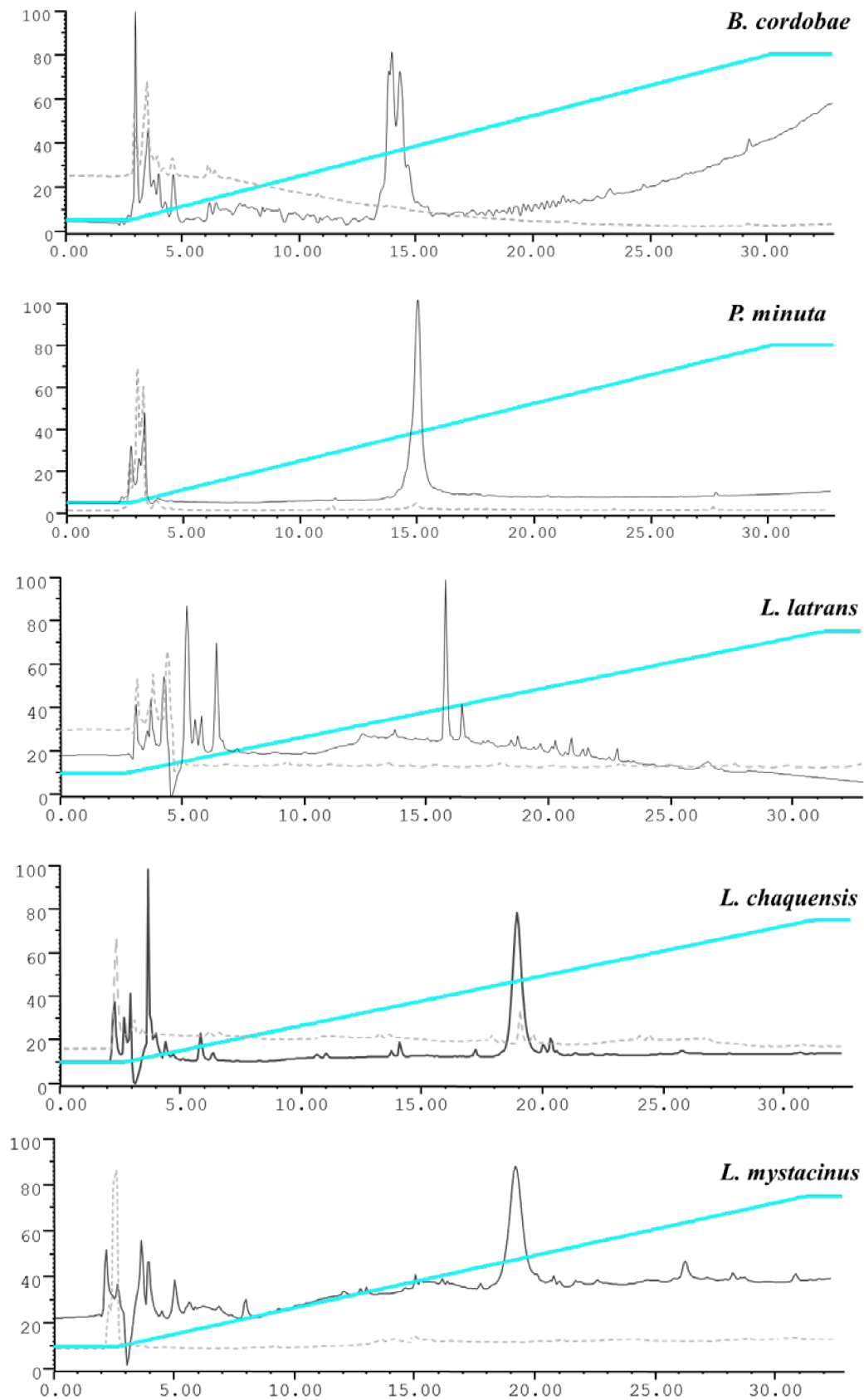
### Análisis cromatográfico mediante RP-HPLC

Los extractos estudiados de ambas familias fueron analizados por HPLC en fase reversa (Figura 23).

Diversos estudios demostraron que, tanto para la identificación como para la cuantificación de péptidos, una adecuada detección se da a longitudes de onda de UV lejano, entre 210 y 220 nm, en las cuales el enlace peptídico absorbe; y entre los 250 y 290 nm donde absorben los aminoácidos Tyr, Trp y Phe [128]. Es debido a esto, que el análisis exploratorio de los extractos se realizó a 220 y 280 nm.

Los cromatogramas mostraron que componentes de los extractos interaccionan de manera diferencial con la columna de C18, denotando la presencia de compuesto de naturaleza tanto hidrofílica como hidrofóbica en todas las especies estudiadas a 220 nm. Mientras que a 280 nm prevaleció la presencia de compuestos hidrofílicos.

Los extractos de ambas familias presentaron picos de absorbancia de una polaridad media con eluciones entre el 40 y 60 % de ACN a 220 nm. Del análisis comparativo entre los resultados de cromatografía a 220 nm y los obtenidos a través del análisis por TLC en el revelado con ninhidrina (ver Figura 22 C), se pudo observar en todas las especies estudiadas la presencia de compuestos de hidrofobicidad media que absorben a 220 nm y reaccionan fuertemente con ninhidrina. Este hecho permite obtener evidencia de la presencia de compuestos peptídicos en los extractos.



**FIGURA 23.** Perfiles de HPLC en fase reversa para los extractos de las familias Hylidae y Leptodactylidae. Columna analítica C18. Gradiente lineal (5 a 80 %) de solución A (0,1 % TFA en agua) a solución B (0,1 % TFA en ACN) por 33 min. Flujo de 0,8 ml/min. Detección: 220 nm (—) y 280 nm (-----).

## Espectrometría de masas MALDI-Tof de los extractos

Se analizaron los extractos de ambas familias mediante espectrometría de masas MALDI-Tof mediante la utilización del método MS reflector positivo, el cual permite identificar iones de bajo peso molecular, y con una intensidad de laser de 4200.

Varios reportes han demostrado que las pieles de los anfibios se encuentran constituidas por una considerable cantidad y variedad de péptidos y proteínas [62; 158]. Este hecho fue observado en los análisis por MALDI-Tof de los extractos, donde se evidenció la presencia de compuestos de un amplio rango de pesos moleculares.

Respecto a la familia Hylidae, el espectro de masas para *B. cordobae* mostró mayor complejidad que el de *P. minuta* (Figuras 24 y 25). Para el primero, se observó la presencia mayoritaria de iones de elevada abundancia relativa con baja relación  $m/z$  entre los 800 y 900, así como compuestos minoritarios en torno a las  $m/z$  1470 y 1942. No se evidenciaron compuestos en la zona media del espectro. La presencia de una importante cantidad de iones a bajas relaciones de  $m/z$  podría deberse a péptidos degradados por enzimas presentes en las pieles de los anfibios. En este sentido, la presencia de una potente endopeptidasa llamada *magainasa* ha sido reportada en la piel del anfibio *X. laevis*, la cual es capaz de reconocer y degradar péptidos helicoidales anfipáticos con más de 12 residuos [159].

La especie *B. cordobae*, posee una estrecha vinculación evolutiva con la especie *B. pulchella*, tan así que son llamadas especies hermanas; se ha demostrado que dichas especies fueron producto de antepasados comunes separados a través de la frontera natural de las sierras cordobesas [160-162]. Siano y col. realizaron estudios en profundidad mediante espectrometría de masas de extractos de la especie *B. pulchella*, mostrando la presencia de un gran número de compuestos de bajo peso molecular con relaciones de  $m/z$  entre 700 y 900 y de alto peso molecular con dos picos de  $m/z$  de 1850 y 1892, asimismo no se observó la presencia de masas intermedias. Estos resultados están en completa concordancia con los obtenidos para *B. cordobae*. Por otro lado, cabe mencionar que la presencia de los iones de  $m/z$  812, 856 y 1850 se observan en ambas especies [62]. *P. minuta* por su parte, presentó iones de una relación de  $m/z$  entre los 1300 y 1500, mostrando poseer compuestos de peso molecular medio (ver Figura 25).

Para la familia Leptodactylidae, los espectros de las especies hermanas *L. latrans* y *L. chaquensis* mostraron ser de una elevada complejidad (Figuras 26 y 27). *L. chaquensis* mostró

---

la presencia de dos picos de elevada abundancia relativa a relaciones de  $m/z$  de 1419 y 1679, además de varios iones de entre los 2200 y 2400. Por su parte, *L. latrans* presentó una diversidad de iones (tanto de baja como de alta relación  $m/z$ ), no observándose la presencia de iones entre los 1600 a 2400. Nascimiento y col. han reportado una serie de péptidos denominados *Ocellatinas* presentes en las pieles de la especie *L. latrans* con notable actividad antimicrobiana. Mediante el análisis de masas aquí llevado a cabo, para la mencionada especie se evidenciaron los iones con  $m/z$  2558, 2250, 2201 y 2274 que corresponderían a las *Ocellatinas* 1, 2, 3 y 4, según los datos reportados en la literatura, que indican para las mismas un peso molecular de 2559, 2250, 2200 y 2274 Da, respectivamente [22].

En lo que respecta a *L. mystacinus*, su espectro mostró una limitada presencia de iones, destacándose por su elevada abundancia los de  $m/z$  1442, 1464, 2465, 2716 y 2800 (Figura 28).

Por otro lado, los resultados obtenidos se muestran en plena concordancia con los resultados de cromatografía TLC revelada con el reactivo de ninhidrina (ver Figura 22 C), donde aquellos extractos que presentaron mayor detección de compuestos peptídicos fueron los que mayores señales mediante espectrometría de masas presentaron.



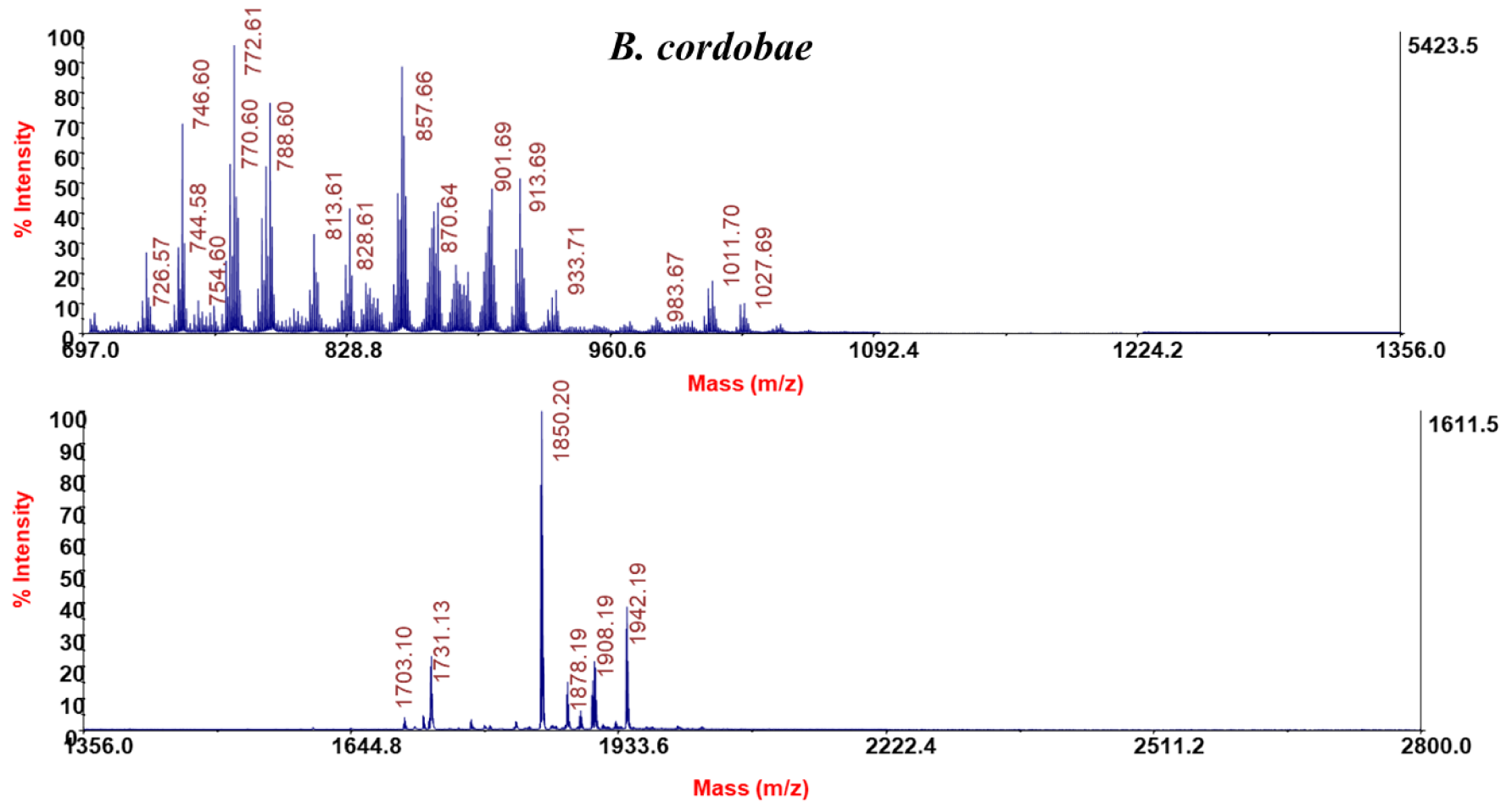


FIGURA 24. Espectros de masas MALDI-ToF del extracto crudo de *B. cordobae*. Método MS reflector positivo. Intensidad de laser 4200.

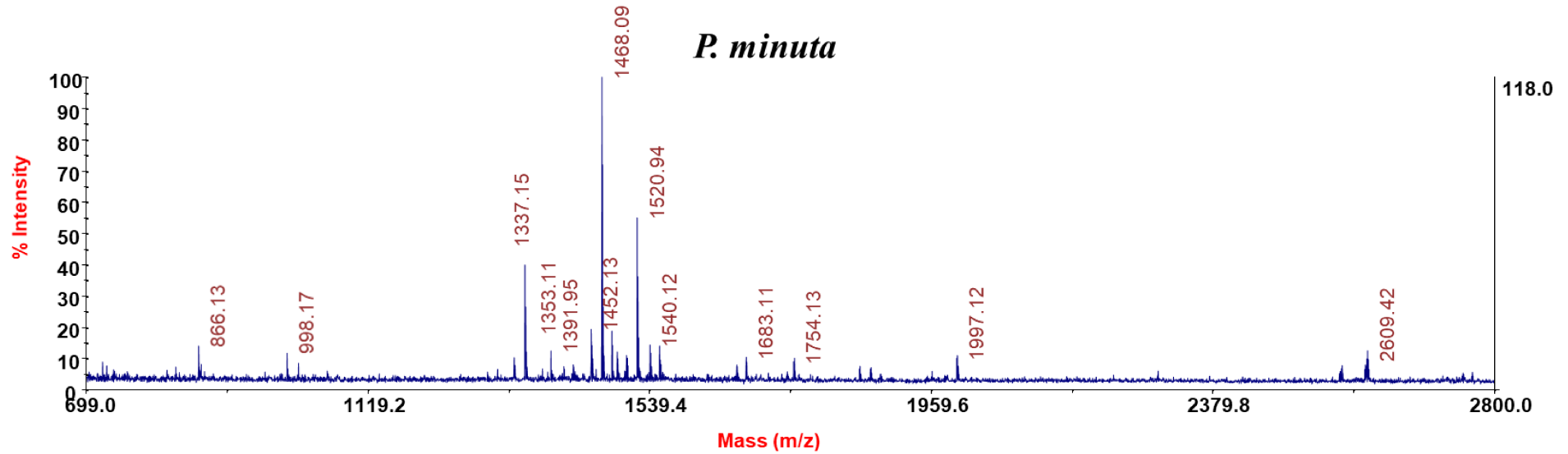


FIGURA 25. Espectros de masas MALDI-ToF del extracto crudo de *P. minuta*. Método MS reflector positivo. Intensidad de laser 4200.

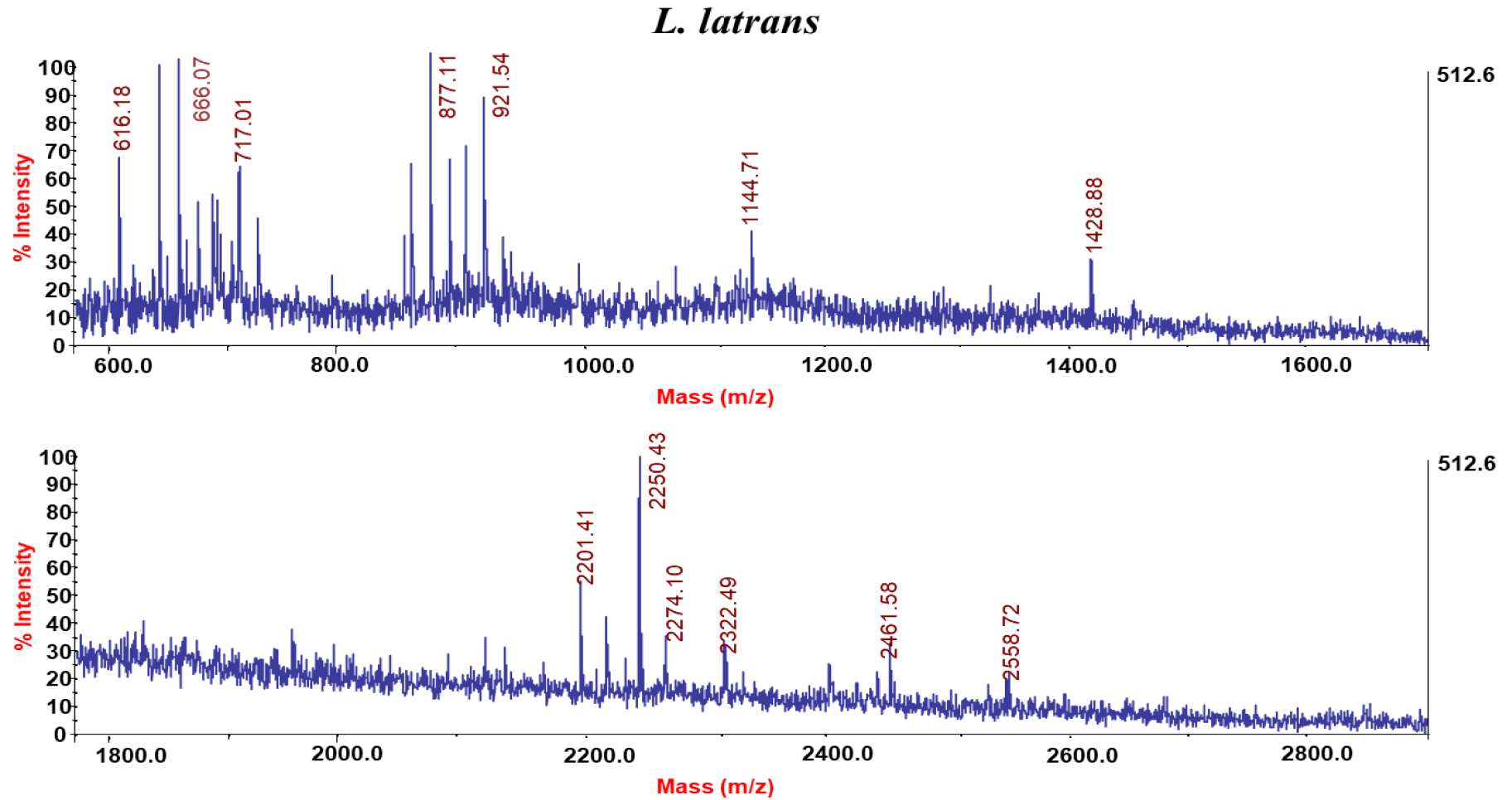


FIGURA 26. Espectros de masas MALDI-ToF del extracto crudo de *L. latrans*. Método MS reflector positivo. Intensidad de laser 4200.

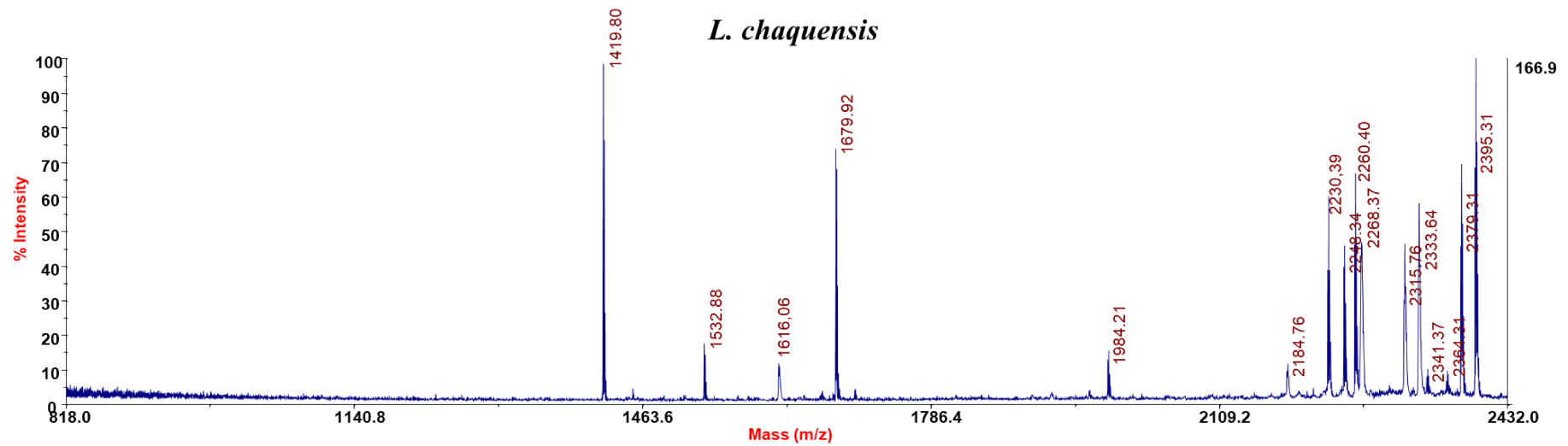


FIGURA 27. Espectros de masas MALDI-ToF del extracto crudo de *L. chaquensis*. Método MS reflector positivo. Intensidad de laser 4200.

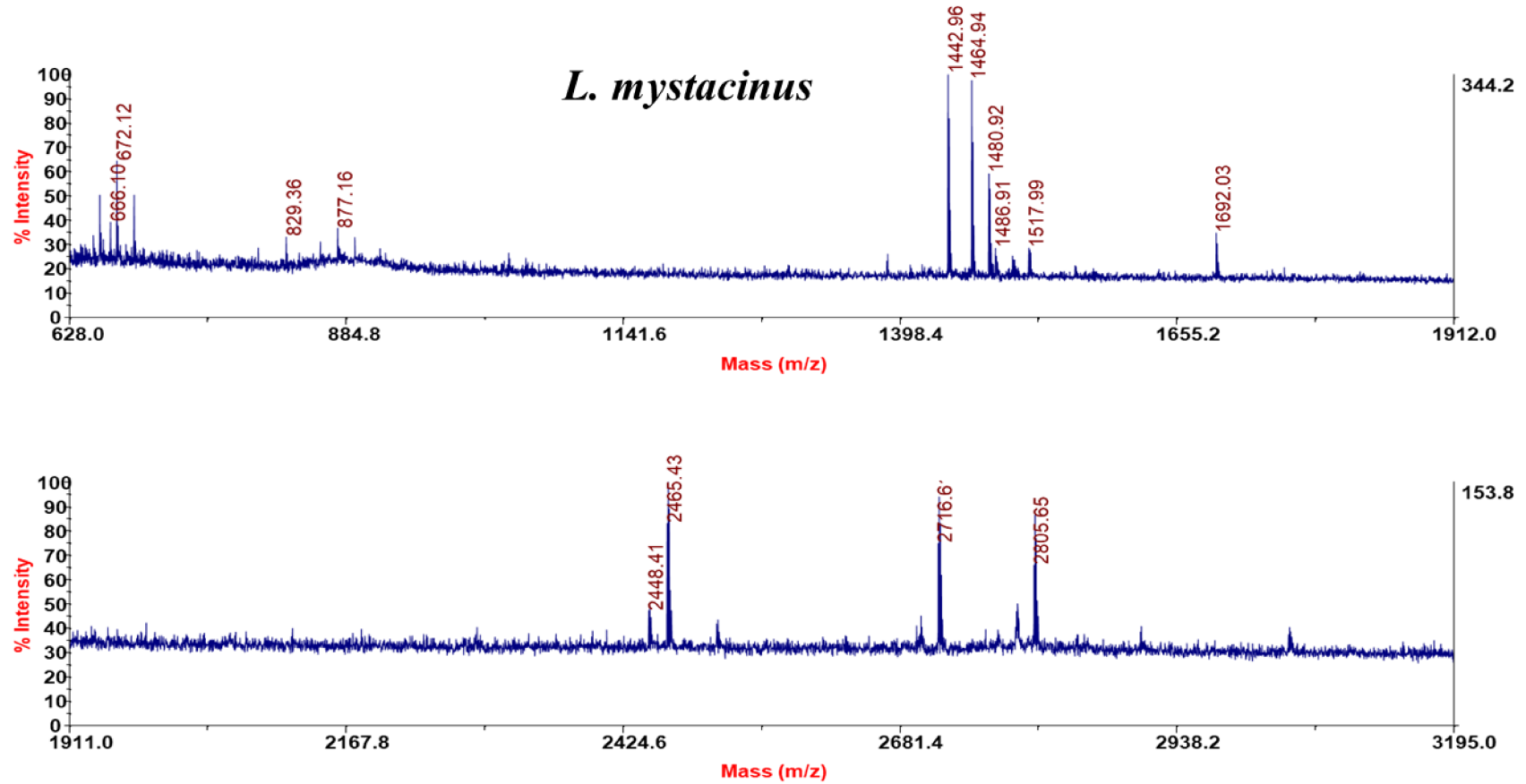


FIGURA 28. Espectros de masas MALDI-ToF del extracto crudo de *L. mystacinus*. Método MS reflector positivo. Intensidad de laser 4200.

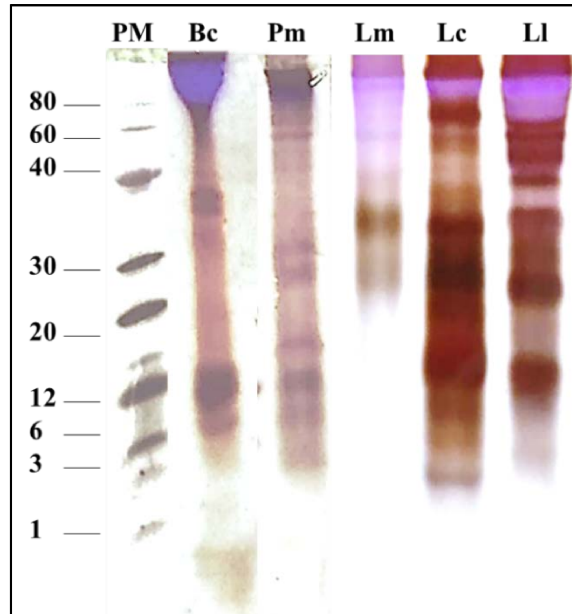
## Electroforesis en geles de tricina SDS-PAGE

A modo de adquirir mayor conocimiento sobre los componentes presentes en los extractos, se realizó un estudio a través de la utilización de geles de electroforesis SDS-PAGE con el agregado de tricina (Figura 29). El agregado de tricina a los geles de SDS-PAGE ofrece gran poder resolutivo en las muestras estudiadas, logrando de este modo cubrir rangos de pesos moleculares más pequeños, y ser una herramienta útil para la detección de proteínas y péptidos pequeños [144].

De los extractos estudiados para la familia Hylidae, tanto *B. cordobae* como *P. minuta* mostraron la presencia de pesos moleculares elevados. Para *B. cordobae*, se evidenciaron bandas correspondientes a pesos moleculares inferiores a 1 KDa, este hecho se correlaciona notablemente con los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas, donde esta especie mostró la presencia de iones de elevada abundancia principalmente con bajas relaciones de  $m/z$ . En lo que respecta a *P. minuta*, los compuestos más pequeños detectados fueron de 3 KDa. Además, cabe mencionar que en ambos extractos se pudieron observar bandas a los 12 y 6 KDa, lo cual podría deberse a compuestos conservados entre especies de la misma familia, dicho resultado también se evidencio en el análisis por TLC a 254 y 365 nm (ver Figura 22).

En lo que respecta a la familia Leptodactylidae los extractos de las especies *L. latrans* y *L. chaquensis* resultaron ser los de mayor complejidad en el rango de los pesos moleculares estudiados. Además, ambas especies presentaron varias bandas conservadas, fenómeno que también pudo ser observado mediante cromatografía TLC (ver Figura 22 A-B), aportando más evidencia sobre la cercanía entre estas especies. Por otro lado, ambas presentan bandas en la cercanía a los 3 KDa en concordancia con lo obtenido mediante espectrometría de masas donde numerosos iones de  $m/z$  entre los 2000 y 3000 fueron observados (ver Figuras 26 y 27). En lo que respecta a *L. mystacinus* solamente pudieron detectarse compuestos de pesos moleculares mayores a los 25 KDa, destacándose una banda con un peso de entre 30 y 40 KDa.

Los estudios llevados a cabo mediante geles de SDS-PAGE con tricina permitieron explorar la composición de los extractos en un rango de pesos moleculares mayor a los estudiados mediante espectrometría de masas. Por lo cual, en lo que respecta al estudio de extractos de pieles de anfibios se propone a la técnica de SDS-PAGE con el agregado de tricina como una herramienta de bajo costo, rápida y de fácil aplicación complementaria a los estudios mediante espectrometría de masas para una mayor exploración de los pesos moleculares.



**FIGURA 29.** Geles de SDS-PAGE con el agregado de tricina y revelado con tinción de plata para los extractos de ambas familias estudiadas. PM: marcador de pesos moleculares (1 a 80 KDa).

La caracterización analítica exploratoria realizada mediante las técnicas de cromatografía RP-HPLC, cromatografía en capa delgada TLC, espectrometría de masas MALDI-Tof, Geles de SDS-PAGE y el dosaje de proteínas por BCA, permitió evidenciar que los extractos de las cinco especies estudiadas poseen un alto nivel de complejidad, mostrando la presencia de compuestos tanto de bajo peso molecular (entre 800 y 3000 Da), así como también de masas que alcanzaron los 80 KDa. Los análisis cromatográficos, por su parte mostraron que los extractos están constituidos por compuestos de naturaleza proteica y/o peptídica que reaccionan con ninhidrina y absorben a 220 nm. Por otro lado, de los extractos de las dos familias estudiadas, los de Hyllidae mostraron poseer el mayor contenido proteico.

### I.3. Actividad de los extractos frente a las colinesterasas

#### Actividad enzimática de AChE y BChE

El ensayo de evaluación de la actividad inhibitoria de las colinesterasas fue llevado a cabo siguiendo la metodología de Ellman [147].

En la Tabla 4 se muestran los valores de IC<sub>50</sub> para AChE y BChE y su selectividad. La IC<sub>50</sub> se define como la concentración de muestra que produce el 50 % de la inhibición enzimática. Mientras que la selectividad nos brinda información acerca de la afinidad de los inhibidores para inhibir una u otra enzima.

TABLA 4. Datos de la inhibición enzimática de la AChE y BChE.

Especie	IC50 (µg/ml) <sup>(a)</sup>		Selectividad <sup>(b)</sup>
	AChE	BChE	
Familia Hylidae			
<i>B. cordobae</i>	375 ± 27	392 ± 14	1,04
<i>P. minuta</i>	507 ± 39	377 ± 1	0,74
Familia Leptodactylidae			
<i>L. latrans</i>	1563 ± 11	NI	-
<i>L. chaquensis</i>	NI	NI	-
<i>L. mystacinus</i>	NI	602 ± 14	-

<sup>(a)</sup> Los valores de IC50 fueron determinados mediante el análisis de la regresión lineal de la determinación de tres replicas. <sup>(b)</sup> Selectividad es definida como IC50 BChE/IC50 AChE. Todos los valores fueron expresados con el 95 % de confianza. NI: no inhibe.

De los extractos estudiados, solo *L. chaquensis* no mostró actividad frente a ninguna de las enzimas ensayadas; para los demás extractos se alcanzaron valores de inhibición que sobrepasaron el 50 % de las actividades enzimáticas, lo cual permitió realizar el cálculo de la IC50 (Figura A1 y A2 – Material Anexo).

Los extractos de la familia Hylidae no solo resultaron ser los más activos, sino que también mostraron la capacidad de inhibir ambas enzimas estudiadas. *B. cordobae* resultó ser el extracto más activo, con valores de IC50 de 392 µg/ml para BChE y de 375 µg/ml para AChE, presentando una selectividad de 1,04 hecho que corrobora la similitud en la potencia de inhibición para ambas enzimas (ver Tabla 4). *P. minuta* por su parte, fue más activa contra BChE que contra AChE, con valores de IC50 de 377 µg/ml y de 507 µg/ml, respectivamente (ver Tabla 4), mostrando un valor de selectividad de 0,74, siendo este extracto de una mayor afinidad inhibitoria para la BChE.

De los extractos de la familia Leptodactylidae, *L. latrans* presentó una baja actividad inhibitoria contra AChE, con un IC50 de 1563 µg/ml, mientras que *L. mystacinus* fue activa solo frente a BChE con un valor de IC50 de 602 µg/ml.

Estudios comparativos previos realizados por Siano y col. [62], sobre especies de anfibios del Litoral argentino en la búsqueda de agentes antimicrobianos, y por Spinelli y col. [163] en la búsqueda de agentes antiproliferativos, reportaron en todos los casos una mayor actividad biológica de las especies de la familia Hylidae sobre Leptodactylidae. Este comportamiento fue también observado en la presente tesis doctoral.



## I.4. Selección de las especies de mayor interés

En base a los resultados obtenidos en los diferentes estudios exploratorios preliminares de los extractos de las familias Hylidae y Leptodactylidae del Litoral argentino, se seleccionaron dos de las cinco especies estudiadas. Las especies seleccionadas fueron *B. cordobae* y *P. minuta*, pertenecientes a la familia Hylidae.

Esta elección se fundamentó en que ambas especies mostraron tener la capacidad de inhibir la actividad enzimática tanto de la AChE como de la BChE. Esto es de gran interés, ya que la teoría colinérgica expresa que la reducción de la sinapsis nerviosa es producto de la disminución del neurotransmisor ACh por acción de la AChE; pero además se ha demostrado que cuando la AChE se encuentra inhibida, la BChE es capaz de suplantar su función manteniendo la reducción de neurotransmisores y, por consiguiente, la sinapsis [82; 164]. Es por ello que, contar con inhibidores duales de ambas colinesterasas resulta prometedor para la búsqueda de compuestos que hagan frente a la Enfermedad de Alzheimer.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento respecto a su acción biológica, a continuación, se detallan los diferentes estudios realizados sobre ambas especies.

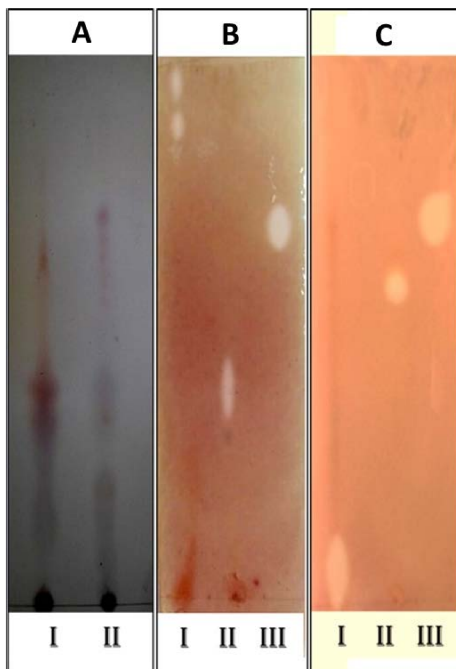
## I.5. Actividad biológica de las especies seleccionadas

### Bioautografía para AChE y BChE

Un primer análisis de ambos extractos seleccionados fue llevado a cabo mediante la técnica de TLC-bioautografía para la AChE y BChE. Esta técnica consiste en desarrollar los extractos mediante cromatografía TLC, y enfrentarlos a un gel el cual contiene las enzimas inmovilizadas junto al sustrato y reactivos cromógenos [165]. Utilizando esta metodología, diversos autores han reportado varios inhibidores enzimáticos para aplicaciones en patologías humanas, como es el caso de inhibidores de la xantina oxidasa [166], la glucosidasa [133], e incluso para la AChE y BChE [167], entre otros.

La TLC-bioautografía, en este caso, se basa en el clivaje del  $\alpha$ -naftil acetato a  $\alpha$ -naftol. El  $\alpha$ -naftol reacciona con el Fast Blue B para dar una tinción de diazonio color violeta. En aquellas regiones de la placa de TLC donde los compuestos presentes en los extractos fueron capaces de inhibir la actividad de las colinesterasas se presentan halos de color blanco en la matriz violeta [168].

*B. cordobae* mostró zonas de inhibición con un Rf de 0,40 para AChE (Figura 30 B) y 0,59 para BChE (Figura 30 C). Es de destacar que estas áreas de inhibición resultaron reactivas con la ninhidrina (Figura 30 A) indicando la presencia de compuestos de naturaleza peptídica.



**FIGURA 30.** TLC-Bioautografía para la detección de inhibidores de las colinesterasas. De izquierda a derecha: (A) Revelado ninhidrina. (B) bioautografía de la AChE (C) bioautografía de BChE. Extracto de *P. minuta* (I), Extracto de *B. cordobae* (II), Control Positivo (Cafeína) (III). La elusión se realizó con n-butanol: ácido acético: agua (55,6: 22,2: 22,2).

Para *P. minuta* se observaron dos zonas de inhibición para AChE con Rfs de 0,86 y 0,95 (Figura 30 B), de las cuales solo la zona del primer Rf reaccionó con ninhidrina (Figura 30 A), mientras que para BChE una potente zona de inhibición se presentó a un Rf de 0,12 (Figura 30 B). El control positivo de cafeína resultó activo para ambas enzimas (Figura 30 B-C) con un Rf de 0,65.

Los productos naturales hasta la fecha continúan siendo los agentes pioneros en el desarrollo de nuevos fármacos [16]. Sin embargo, la exploración de estos resulta laboriosa debido a la gran complejidad de compuestos que los constituyen. La TLC-bioautografía es una técnica que combina un proceso separativo por cromatografía con un ensayo biológico de fácil detección, permitiendo así identificar que zonas del producto natural estudiado resultan activas. Desde que la TLC-bioautografía tuvo sus comienzos como técnica exploratoria de productos naturales con actividad antimicrobiana, se ha ido adaptando para abarcar nuevas actividades biológicas, como ser la búsqueda de agentes antioxidantes y más recientemente de inhibidores

enzimáticos [130; 169-171]. En lo que respecta a inhibidores enzimáticos diversos compuestos fueron aislados con éxito a través de la mencionada metodología. Para las enzimas AChE y BChE se ha demostrado la utilidad de la TLC-bioautografía para detectar alcaloides, terpenoides y metabolitos secundarios obtenidos de plantas [167]. Por otro lado, Salazar y Furlan (2007) desarrollaron una metodología para la detección de inhibidores de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, permitiendo evidenciar de manera sencilla y rápida compuestos bioactivos en los extractos de las plantas *Solanum diflorum* y *Setaria parviflora* [133]. De igual manera Garcia y col. demostraron la bioactividad de aceites esenciales de la planta *Foeniculum vulgare* frente a la enzima xantina oxidasa [172] y la actividad del ácido kójico presente en *Calamagrostis viridiflavescens* frente a la enzima tirosinasa [132].

En la presente tesis, se evaluaron por primera vez extractos de pieles de anfibios mediante la utilización de la TLC-bioautografía frente a las enzimas AChE y BChE. La aplicación y puesta a punto de esta técnica resultó ser una herramienta reproducible y fácil de llevar a cabo, que permitió evidenciar las zonas de inhibición de los extractos, además de poder observar si esas zonas correspondían a compuestos de naturaleza peptídica.

### Estudios de la actividad cinética de AChE y BChE frente a los extractos

Los estudios de las actividades cinéticas que se detallan a continuación fueron realizados sobre ambos extractos con el objetivo de lograr una mayor comprensión respecto a su actividad biológica. El estudio de los parámetros cinéticos representa una herramienta útil para adquirir datos necesarios para la caracterización enzimática de los inhibidores. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  resultan críticos para la identificación de inhibidores reversibles, tanto competitivos como no competitivos, ya que estos fenómenos son definidos en términos de efectos significativos sobre los parámetros  $K_m$  y/o  $V_{max}$  en presencia y ausencia de inhibidor (ver Tabla 2) [173].

Los análisis cinéticos para AChE y BChE de ambos extractos fueron llevados a cabo mediante curvas de Michaelis-Menten, a las concentraciones de  $IC_{50}$  obtenidas previamente (ver Tabla 4) (Figura 31 y 32). Además, los tipos de inhibición enzimática fueron calculados mediante un test de ANOVA de una vía (Tabla 5).

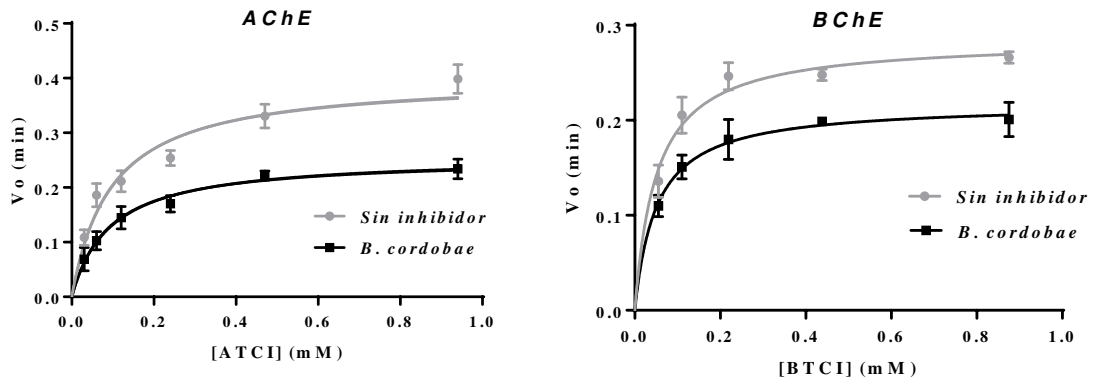
Los estudios de ambas enzimas (AChE y BChE) en presencia y ausencia del extracto de *B. cordobae* mostraron valores de  $V_{max}$  que resultaron significativamente diferentes, con un valor  $P < 0,05$ , mientras que los valores de  $K_m$  fueron no significativamente diferentes, con un

valor  $P > 0,05$ . Este hecho evidencia que los compuestos inhibidores presentes en el extracto de *B. cordobae* actúan de manera no competitiva, tanto para AChE como para BChE (ver Tabla 5). Para *P. minuta* se observó un tipo de inhibición competitiva tanto para AChE como para BChE, presentando valores de  $V_{max}$  que no fueron significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ); mientras que los valores de  $K_m$  resultaron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), en presencia y ausencia del extracto (ver Tabla 5).

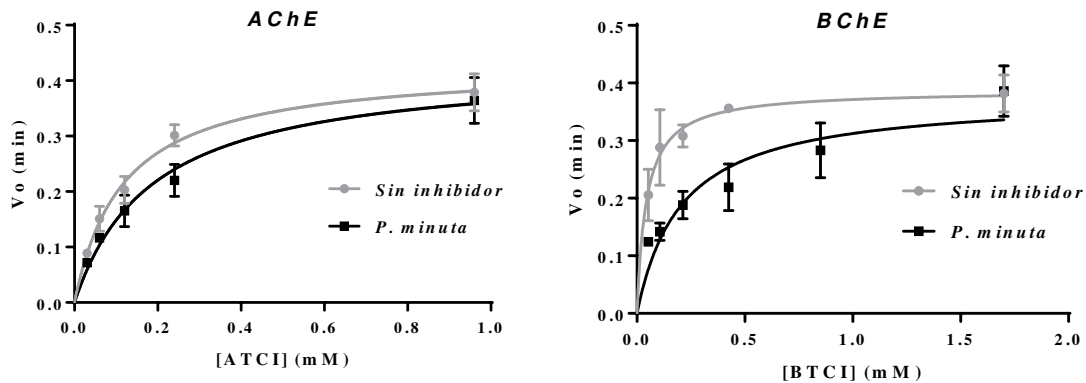
**TABLA 5.** Tipo de inhibición y parámetros cinéticos enzimáticos obtenidos para AChE y BChE en presencia y ausencia de los extractos.

<i>B. cordobae</i>							
Enzima	$V_{max}^{(a)}$			$K_m^{(a)}$			Tipo de inhibición <sup>(c)</sup>
	Basal	Inhibidor	P valor <sup>(b)</sup>	Basal	Inhibidor	P valor <sup>(b)</sup>	
<i>AchE</i>	0.402 ± 0.019	0.254 ± 0.010	0.0003	0.098 ± 0.015	0.090 ± 0.012	0.5270	No competitiva
<i>BChE</i>	0.282 ± 0.008	0.217 ± 0.008	0.0005	0.054 ± 0.007	0.050 ± 0.009	0.5966	No competitiva
<i>P. minuta</i>							
<i>AchE</i>	0.427 ± 0.017	0.430 ± 0.024	0.8792	0.106 ± 0.013	0.220 ± 0.029	0.0036	Competitiva
<i>BChE</i>	0.387 ± 0.022	0.387 ± 0.033	0.6725	0.043 ± 0.012	0.207 ± 0.057	0.0085	Competitiva

<sup>(a)</sup>  $V_{max}$  y  $K_m$  fueron determinados utilizando curvas de Michaelis-Menten y expresados con una confianza del 95 % a concentraciones de IC50 de los extractos. <sup>(b)</sup> El P valor fue obtenido mediante un test de ANOVA de una vía, ( $P < 0,05$ ) valores significativamente diferentes, ( $P > 0,05$ ) valores significativamente no diferentes. <sup>(c)</sup> Tipo de inhibición calculada mediante el análisis del P valor entre  $V_{max}$  y  $K_m$  en presencia y ausencia de extracto inhibidor. Inhibición competitiva: valores iguales de  $V_{max}$  y diferentes de  $K_m$ . Inhibición no competitiva: diferentes valores de  $V_{max}$  e iguales de  $K_m$ .



**FIGURA 31.** Curvas de Michaelis-Menten del extracto de *B. cordobae* a dosis de IC50 (375  $\mu\text{g/ml}$  para AChE y 392  $\mu\text{g/ml}$  para BChE) y sin inhibidor. Estos estudios fueron realizados a concentraciones variables de los sustratos ATCI y BTCl.



**FIGURA 32.** Curvas de Michaelis-Menten del extracto de *P. minuta* a dosis de IC50 (507  $\mu\text{g/ml}$  para AChE y 377  $\mu\text{g/ml}$  para BChE) y sin inhibidor. Estos estudios fueron realizados a concentraciones variables de los sustratos ATCI y BTCl.

Para las colinesterasas, un importante número de trabajos han reportado que los inhibidores de tipo competitivo actúan impidiendo el ingreso del sustrato mediante interacción con el sitio el sitio activo CAS de estas enzimas [174-176]. Estudios realizados por Mohan y Gupta revelaron que una inhibición de tipo no competitiva para las colinesterasas se debe a la interacción de los compuestos inhibidores con el sitio PAS [177]. El sitio PAS se encuentra sobre la superficie de la AChE y BChE, aproximadamente a 20 Å del sitio activo [83], teniendo como función unir ACh como parte de la primera etapa de la vía catalítica, y modular así alostericamente la catálisis [178-179]. Se ha identificado que el sitio PAS posee funciones no colinérgicas en la AChE, uniendo al péptido A $\beta$ , y estimulando su agregación e incrementando la neurotoxicidad de este [180]. Es debido a esto que la inhibición del sitio PAS juega un rol clave en la EA. Los primeros reportes de péptidos naturales con una poderosa y

selectiva función inhibitoria frente a la AChE fueron las *fasciculinas I, II y III*, aisladas del veneno de la mamba verde, *Dendroaspis angusticeps* [181-182]. Las *fasciculinas* han demostrado ser inhibidores no competitivos de la AChE a través de la interacción con residuos aromáticos del PAS [183]. En los últimos años, péptidos aislados de las pieles de anfibios con actividad inhibitoria de las colinesterasas han sido reportados por Siano y col. [29; 61]. Los péptido *Hp-1971* y *Hp-1935* aislados de la piel de *Boana pulchella* (Anura: Hylidae), demostraron poseer la capacidad de inhibir de forma no competitiva a la AChE y la BChE, y notablemente esta inhibición se dio a través de la unión de los inhibidores a residuos del sitio PAS [61]. Estas investigaciones sustentan lo reportado por Mohan y Gupta, en cuanto a que una inhibición no competitiva para las colinesterasas estaría dada por interacción mediante el sitio PAS.

En el presente capítulo, se exploran los extractos crudos de *B. cordobae* y *P. minuta* pertenecientes a la familia Hylidae, donde se evidenció que estos poseen una notable actividad inhibitoria, que supera la reportada previamente para extractos de la especie de anfibio *B. pulchella* [62]. Es de destacar que el extracto de *B. cordobae* posee una inhibición de tipo no competitiva, lo que indicaría que los compuestos presentes en él podrían actuar mediante interacción con el sitio PAS de la enzima. Es por todo esto que, el estudio en profundidad de ambos extractos resulta promisorio para el aislamiento de moléculas bioactivas con función anticolinesterásica.

### Actividad inhibitoria de los extractos frente a la MAO-B

La EA representa una compleja enfermedad multifactorial en la cual diversas vías metabólicas se ven afectadas. Las colinesterasas y las MAOs se encuentran íntimamente asociadas en lo que respecta a la sintomatología y progresión de la Enfermedad. Motivo por el cual, el uso de inhibidores que actúen sobre ambas familias de enzimas se propone como estrategia para alterar el curso y generar un alivio en la sintomatología de la EA [184].

Más de 15 años de investigación han llevado a la identificación de varios inhibidores duales de las colinesterasas y las MAOs, de los cuales algunos han mostrado superar positivamente etapas de pruebas clínicas [184]. Uno de los más prometedores es el Ladostigil, un derivado de carbamatos, el cual demostró inhibir tanto a la AChE (IC<sub>50</sub> = 50 μM) como a la MAO-B (IC<sub>50</sub> = 37 μM), y ha alcanzado satisfactoriamente ensayos

clínicos de fase 2 [185-186]. Estos prometedores resultados han hecho que los esfuerzos en la búsqueda de inhibidores duales de las ChEs y las MAOs se vean incrementados en los últimos tiempos.

Con el fin de estudiar la capacidad multiobjetivo de los extractos de pieles de anfibios, se ensayó la actividad inhibidora frente a la MAO-B. En la Tabla 6 se muestran los valores de IC50 obtenidos para ambos extractos.

**TABLA 6.** Datos de la inhibición *in vitro* de la MAO-B para los extractos.

Especies	IC50 (µg/ml) <sup>(a)</sup>
<i>B. cordobae</i>	>800
<i>P. minuta</i>	610 ± 23

<sup>(a)</sup> Los valores de IC50 fueron determinados mediante análisis de regresión de triplicados. Todos los valores fueron expresados con un intervalo de confianza del 95 %.

*P. minuta* mostró actividad inhibitoria frente a la MAO-B con un valor de IC50 de 610 µg/ml (ver Tabla 6). Este hecho, sumado a su actividad frente a AChE (IC50= 507 µg/ml) y BChE (IC50= 377 µg/ml), lo convierten en un candidato para el estudio de inhibidores multiobjetivo de las colinesterasas y MAO-B.

Por otro lado, el extracto completo de *B. cordobae* resultó activo contra la enzima MAO-B, pero los valores obtenidos no permitieron calcular la IC50 a las concentraciones ensayadas, ya que se alcanzó un máximo de inhibición del 20 % a una concentración de 800 µg/ml (Figura A3 – Material Anexo y Tabla 6). A diferencia de lo observado para las ChEs, donde resultó notablemente activo, para la MAO-B el extracto completo de *B. cordobae* mostró moderada actividad. Este hecho se podría adjudicar a que los compuestos activos se encuentran en baja concentración en la muestra completa, requiriéndose el aislamiento de las moléculas individuales para un estudio en profundidad. En base a esto, varios reportes mostraron para las MAOs que los extractos crudos presentan una actividad inhibitoria discreta comparada las obtenidas cuando se ensayan las moléculas individuales aisladas [187]. Por ejemplo, extractos crudos de la planta *Rhodiola rosea* mostraron porcentajes de inhibición que alcanzaron un 67 % de inhibición para MAO-B a una concentración de 100 µg/mL [188], mientras que los compuestos individuales aislados de *R. rosea* presentaron una potencia superior a los dos órdenes de magnitud (*rosiridina* IC50= 5,38 µg/mL y *galato de epigalocatequina* IC50= 4,82 µg/mL) [189].



Diversas investigaciones han demostrado el potencial de los productos naturales como inhibidores de la MAO-B [190]. Uno de ellos, un extracto metanólico de las raíces de la planta india *Asparagus racemosus*, mostró actividad inhibitoria de la MAO-B (IC<sub>50</sub>=14000 µg/mL), pero además presentó la capacidad de modular tanto a la AChE como a la BChE, actuando como agente multimodulador [191].

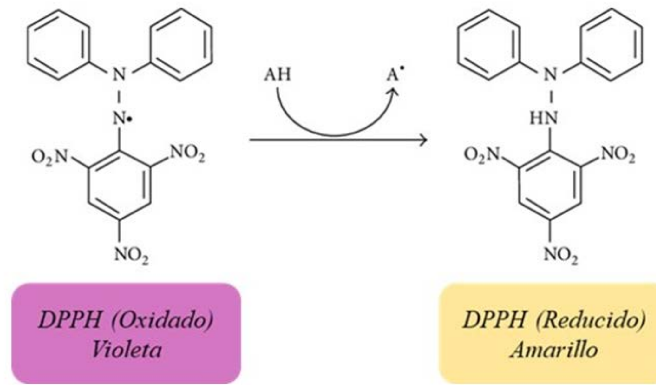
Los compuestos inhibidores de las MAOs aislados de fuentes naturales son de una gran diversidad molecular, entre las cuales se encuentran flavonoides, cumarinas, péptidos y alcaloides [190; 192-195]. En lo que respecta a péptidos, el veneno del escorpión *Mesobuthus gibbosus* ha sido el único reportado con actividad inhibitoria de las MAOs, pero actuando selectivamente frente a la MAO-A [192]. Esto resulta de interés, ya que el trabajo realizado en la presente tesis representa el primero en vislumbrar la actividad inhibitoria de la MAO-B por parte de los extractos de pieles de anfibios, siendo los mismos, además, de naturaleza peptídica.

### Actividad neuroprotectora de los extractos

Estudios recientes han demostrado que tanto la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, como el desbalance de biometales (Fe, Cu, y Zn) en el cerebro contribuye notablemente en la patogénesis de la EA [104; 196]. Por lo que, la utilización de agentes tanto antioxidantes como quelantes resultan muy prometedores por su acción neuroprotectora.

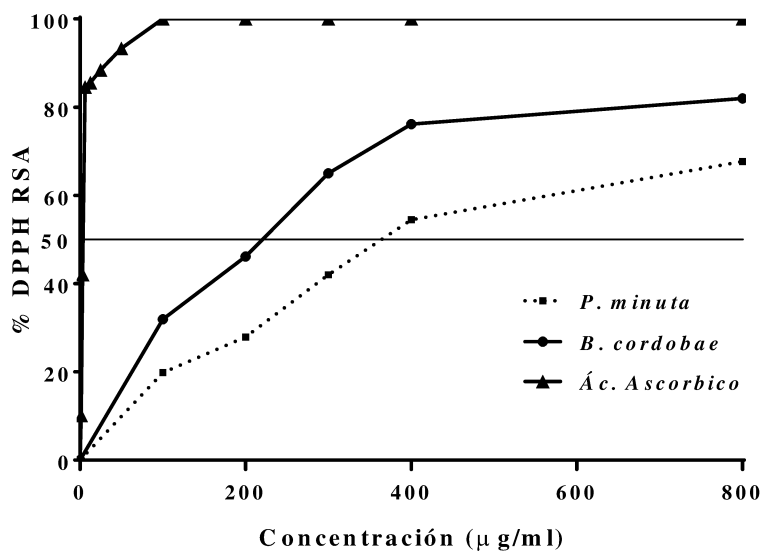
### Antioxidantes

La actividad antioxidante de los extractos fue determinada mediante el ensayo del DPPH. El ensayo de DPPH fue desarrollado por Blois [197] con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante de compuestos, mediante la utilización de un radical libre muy estable. El radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH), posee en su estructura un átomo de nitrógeno con un electrón desapareado, el cual se encuentra fuertemente estabilizado por deslocalización, evitando la formación de dímeros como otros radicales libres. La deslocalización también produce que este compuesto posea un color violeta intenso. Cuando compuestos antioxidantes son capaces de donar un protón a la molécula de DPPH se da lugar a la forma reducida de la molécula haciendo que pierda su coloración violeta (Figura 33) [198].



**FIGURA 33.** Estructura molecular del radical libre DPPH. Viraje desde su forma oxidada (violeta) a reducida (amarillo). Representaciones realizadas con ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

La Figura 34 muestra las gráficas de dosis respuesta para los extractos estudiados. El análisis de la capacidad antioxidante se evaluó según la concentración efectiva 50 (EC50), la cual representa la concentración de extracto requerido para alcanzar el 50 % de captura del radical libre (Figura A4 – Material Anexo).



**FIGURA 34.** Curva de dosis respuesta para la actividad antioxidante expresada como % de RSA DPPH versus la concentración de extractos.

Ambos extractos estudiados mostraron significativa capacidad de capturar el radical libre DPPH. *B. cordobae*, resultó el más activo con un valor de EC50 de 198 µg/ml, mientras que para *P. minuta* fue de 370 µg/ml. Mediante el análisis de la curva de dosis respuesta (ver Figura 34), se pudo observar que los extractos resultan antioxidantes a las concentraciones de actividad biológica frente a las enzimas colinesterasas (ver Tabla 4) y MAO-B (ver Tabla 6). Esto evidencia que los extractos de las pieles de las especies

---

estudiadas poseen compuestos capaces de actuar, de manera individual o conjunta como agentes multiobjetivos de la EA.

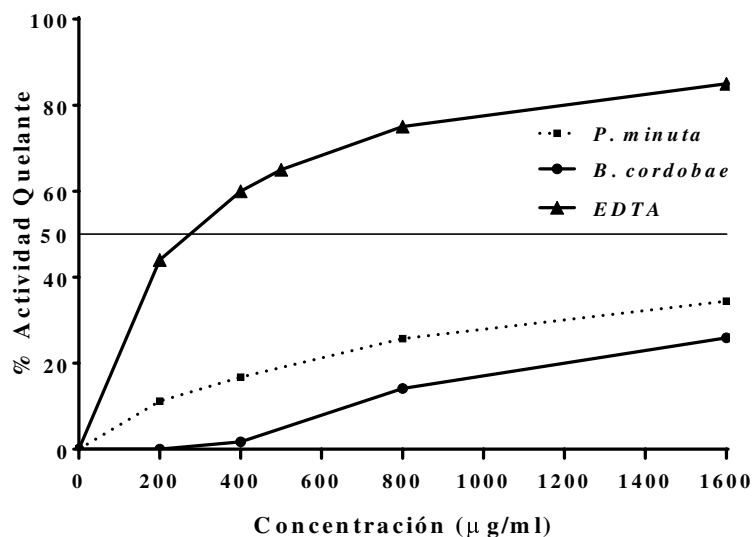
El ácido ascórbico, potente agente antioxidante fue utilizado como control positivo en el ensayo de DPPH, obteniéndose un valor de EC<sub>50</sub> de 4 µg/ml. Otro reconocido producto natural es el *Ginko bilioba*, el cual posee un amplio repertorio de aplicaciones en salud humana, actuando como vasodilatador a nivel periférico, antiagregante plaquetario, antihemorroidal, diurético, antioxidante, e incluso resultó potencialmente beneficioso para la mejora de la función cognitiva, en pacientes con deterioro cognitivo en la EA [199-200]. Los extractos obtenidos del *Ginko bilioba* muestran una capacidad antioxidante frente al DPPH con valores de EC<sub>50</sub> entre 11 a 159 µg/ml [201]. La comparativa de los valores de actividad antioxidante del *Ginko bilioba* con las especies aquí estudiadas nos permite comprender el potencial de los extractos, ya que estos muestran valores similares a los obtenidos para *B. cordobae* y *P. minuta*.

Si bien las plantas representan la fuente de agentes antioxidantes por excelencia, siendo compuestos como los tocoferoles, polifenoles y carotenoides los más reportados y de mayor potencia [115], recientemente se ha demostrado que las pieles de anfibios son una fuente rica en compuestos antioxidantes. La piel de los anfibios al encontrarse semi desnuda, está expuesta a grandes niveles de estrés oxidativo, tanto de fuentes endógenas como exógenas, resultando el órgano de mayor exposición a radicales libres. Debido a esto, los anfibios han desarrollado varios mecanismos basados en biomoléculas para hacer frente al aumento de este estrés oxidativo, entre los que se encuentran principalmente los péptidos [60; 202]. El potencial de los péptidos como agentes capturadores de radicales libres es principalmente debido a su composición aminoacídica, su estructura e hidrofobicidad. Residuos aromáticos son capaces de donar electrones mientras mantienen su estabilidad mediante estructuras de resonancia [203]. Además, la presencia de aminoácidos hidrofóbicos permiten mejorar las propiedades antioxidantes [204]. Por otro lado, estudios de espectrometría de masas realizados por Xiao y col. en las especies de ranas *Amolops daiyunensis*, *Pelophylax hubeiensis*, *Hylarana maosuoensis* y *Nanorana pleskei* evidenciaron que los péptidos antioxidantes presentan masas relativamente pequeñas, comprendidas entre los 1300 a 4000 Da [202]. La caracterización analítica realizada sobre los extractos de *B. cordobae* y *P. minuta* demostró que estos se encuentran constituidos por compuestos con dichas características, observándose la presencia de

moléculas aromáticas que absorben a 280 nm (ver Figura 23), compuestos de cierta hidrofobicidad que reaccionan con ninhidrina (ver Figura 22), y además estar constituidos por moléculas de bajo peso molecular (ver Figuras 24 y 25). Por lo anteriormente expuesto es que, podría adjudicarse la capacidad antioxidante a los péptidos presentes en los extractos.

### Agentes quelantes

Por otro lado, metales con capacidad redox activa como ser el Fe, Cu o Zn están involucrados en la transferencia de electrones entre metales y sustratos, por lo que juegan un rol clave en mantener la homeostasis redox en los sistemas biológicos. La disrupción de este equilibrio redox resulta en un estrés oxidativo, elevando las ROS y generando severos daños fisiológicos [205]. En la EA se observó que pacientes que presentan un desequilibrio de estos biometales, principalmente del Fe, no solo generan ROS, sino que también presentan incremento en la agregación de las placas seniles del péptido A $\beta$  [114]. Debido a esto se ha propuesto la utilización de agentes quelantes como neuroprotectores. En la presente tesis se evaluó la capacidad de los extractos de quelar al ion Fe<sup>+2</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35.



**FIGURA 35.** Curva de dosis respuesta para la actividad quelante versus la concentración de extractos.

Si bien ambos extractos, a la mayor concentración ensayada, mostraron capacidad quelante del ion Fe<sup>+2</sup>, con valores de 34 y 26 % para *P. minuta* y *B. cordobae*, respectivamente, estos no superaron el 50 % de actividad, por lo cual los valores de EC50

no pudieron ser calculados. El EDTA utilizado como control positivo presentó un  $EC_{50}=230 \mu\text{g/ml}$ .

La actividad quelante se encuentra estrechamente relacionada con la capacidad antioxidante. Algunos autores clasifican a la actividad quelante como una acción antioxidante, debido a que dicha actividad tiene como finalidad evitar la generación de radicales libres como consecuencia de los metales pesados [206]. De igual modo que lo discutido anteriormente para los agentes antioxidantes, la fuente principal de compuestos quelantes proviene de extractos de plantas. La *curcumina*, un diarilheptanoide, aislado a partir del rizoma de la planta *Curcuma longa*, ha demostrado ser un notable agente quelante del ion metálico  $\text{Fe}^{+2}$  ( $EC_{50}=460 \mu\text{g/ml}$ ) [207]. Por otro lado, el polifenol *galato de epigallocatequina*, presente abundantemente en el Té verde y en las semillas de uva, presentó una potente capacidad de quelar el  $\text{Fe}^{+2}$ , con un  $EC_{50}$  de  $2,2 \mu\text{g/ml}$  [208]; además, su administración a largo plazo, demostró mejorar las respuestas cognitivas y habilidades de aprendizaje en ratones genéticamente modificados, al reducir la amiloidosis, representando una gran promesa para su aplicación en la EA [209].

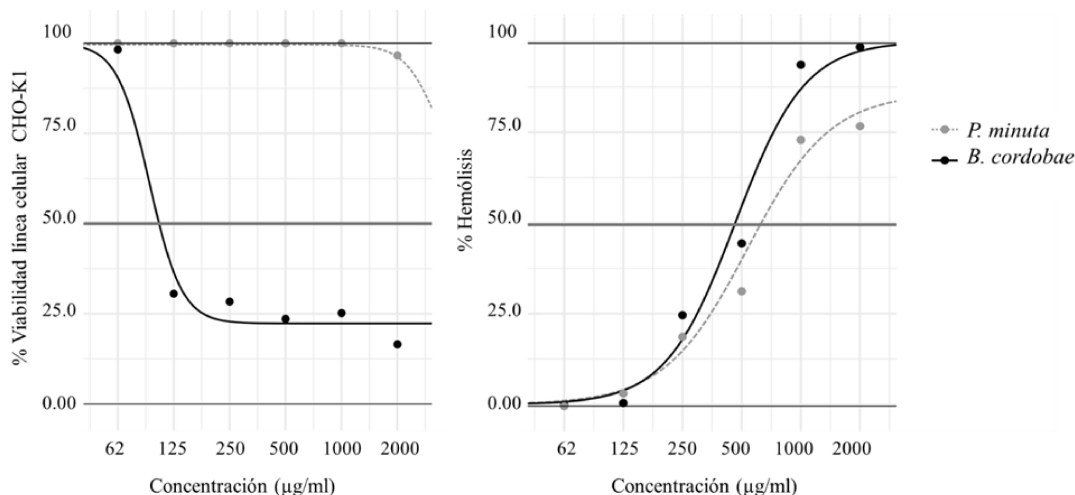
En lo que respecta a péptidos con actividad quelante, los principales reportes provienen de péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas de mayor tamaño, tanto de origen animal como vegetal. Dentro de los de origen animal los hidrolizados de caseína, principal proteína de la leche, a través del tratamiento con tripsina o quimiotripsina, dan origen a diferentes fosfopéptidos de caseína capaces de unirse a al Ca, Zn y Fe [210]. La caseína de leche de cabra en su estado completo presenta la capacidad de quelar el  $\text{Fe}^{+2}$  con una  $EC_{50}$  de  $262 \mu\text{g/ml}$ , mientras que sus hidrolizados lo hacen con  $EC_{50}$  alrededor de  $48 \mu\text{g/ml}$ , demostrando el potencial de los péptidos sobre las proteínas [211]. Muchos subproductos del pescado, principalmente pieles y espinas, también han mostrado capacidades quelantes de metales, prevaleciendo nuevamente la actividad de los péptidos hidrolizados sobre las proteínas completas [212]. La actividad quelante de los péptidos es determinada por interacciones de tipo proteína-metal, dependiendo principalmente de la composición de los aminoácidos y de la disposición espacial de estos para poder formar las interacciones electrostáticas o puente de hidrógeno [213].

Los extractos aquí estudiados mostraron la capacidad de quelar al ion  $\text{Fe}^{+2}$ , y de estar constituidos por compuestos peptídicos. Cabe destacar que hasta la fecha no hay

reportes sobre la capacidad de los extractos crudos de pieles de anfibios como agentes quelantes.

## I.6. Evaluación de la toxicidad

Con el objetivo que estudiar los efectos toxicológicos de ambos extractos, se determinó su actividad lítica frente a glóbulos rojos humanos sanos, y su toxicidad frente a células de mamíferos CHO-K1 (Figura 36).



**FIGURA 36.** Curvas dosis respuesta del análisis de toxicidad de los extractos. % de viabilidad de la línea celular CHO-K1 (izquierda) y % de hemólisis de glóbulos rojos humanos (derecha).

*P. minuta* mostró no ser citotóxico contra la línea celular CHO-K1 a las concentraciones ensayadas, mientras que el 50 % de actividad hemolítica se alcanzó a los 660 µg/ml (ver Figura 36). El 50 % de actividad para AChE, BChE, MAO-B y actividad antioxidante fueron alcanzados a 507 µg/ml, 377 µg/ml, 610 µg/ml y 370 µg/ml, respectivamente, siendo este extracto más activo que citotóxico. Este hecho hace que la especie *P. minuta* sea prometedora.

Por otro lado, *B. cordobae* alcanzó el 50 % de actividad citotóxica contra CHO-K1 a los 460 µg/ml, hemólisis a los 100 µg/ml (ver Figura 36), actividad antioxidante a los 198 µg/ml, mientras que el 50 % de actividad para AChE, BChE fue a los 375 µg/ml 392 µg/ml, respectivamente.

La evaluación de la toxicidad de una muestra resulta de suma importancia, ya que puede ser un factor limitante de su aplicabilidad. Estudios previos han demostrado que el potencial biológico de los extractos de pieles de anfibios tiene su limitación en la

citotoxicidad que estos presentan [7; 15]. Sin embargo, es esencial remarcar que la presencia de cierto grado de toxicidad en los extractos, es un indicador de la presencia de compuestos bioactivos poderosos, como varios autores ya lo han demostrado [214-215].

Las secreciones bioactivas de las pieles de los anfibios se encuentran constituidas por moléculas de diferente naturaleza: alcaloides, péptidos, aminas biógenas y esteroides [7]. Tanto los alcaloides como, las aminas biógenas han demostrado ser las moléculas principalmente responsables de la toxicidad de los extractos crudos [216-217]. Por otro lado, si bien ciertos péptidos aislados de pieles de anfibios han presentado actividad hemolítica, estos pertenecían principalmente a la familia Leptodactylidae, como es el caso de las *Ocellatinas* [22]. Mientras que, los de la familia Hylidae, como ser la superfamilia de péptidos *Dermaseptinas* y *Raniseptinas* mostraron ser de baja a nula capacidad tóxica frente a glóbulos rojos humanos [218]

Es por todo esto que, aunque el extracto de *B. cordobae* presenta cierto grado de toxicidad contra las células CHO-K1, resulta de gran interés para su estudio en profundidad debido a la notable actividad biológica y a que se encuentra constituido principalmente por péptidos.

# CAPÍTULO II

Purificación y análisis  
peptidómicos de los extractos de  
*B. cordobae* y *P. minuta*

Lic. Roque Spinelli



# CAPÍTULO II

## Introducción

Purificación y análisis  
peptidómicos de los extractos de  
*B. cordobae* y *P. minuta*

Lic. Roque Spinelli

## II: INTRODUCCIÓN

### II.1. Espectrometría de masas análisis de polipéptidos

Durante el Capítulo I se mencionó que la espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica altamente sensible que permite realizar, en términos generales, determinaciones estructurales, identificaciones y análisis en el orden de trazas; de compuestos en base a su peso molecular (Ver Sección I.6, Introducción - Capítulo I).

Existen dos técnicas principales para la ionización de los analitos: Ionización por electrospray (ESI) y Desorción/Ionización por láser asistida por matriz (MALDI). La primera presenta la ventaja distintiva de su compatibilidad *online* con técnicas separativas. Es decir, que la ionización por ESI, concede la posibilidad de acoplarse a métodos separativos como ser HPLC o nano-HPLC, permitiendo la separación previa de una muestra compleja antes de ser analizada en el espectrómetro de masas [219]. Distintos tipos de analizadores de MS de moléculas orgánicas termoestables de bajo peso molecular han sido exitosamente acoplados al método de ionización ESI. Este hecho representó un veloz desarrollo de la técnica de ESI-MS, a tal punto que, a mediados de la década de los '90, se extendió el pensamiento que su eficacia era de mayor utilidad que la espectrometría MALDI-MS. Por otro lado, el analizador de masas de trampa de iones está basado en la utilización de una zona de confinamiento electromagnética por medio de dos señales de radiofrecuencia. La trampa puede ser ajustada para almacenar iones de una determinada relación de  $m/z$ , y al modificar las condiciones de operación, iones de un valor  $m/z$  especificado podrán salir o ser expulsados de la trampa [220]. Una modificación de este tipo de analizadores dio origen a los espectrómetros de tipo Orbitrap. El Orbitrap, es un analizador de masas de trampa de iones que consta de dos electrodos externos y un electrodo central, que le permiten actuar tanto de analizador como de detector. Los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos, y debido a que su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga, los iones comienzan a girar alrededor del electrodo central quedando atrapados dentro. Los iones oscilan circularmente alrededor del huso central a diferentes frecuencias según su relación de  $m/z$ , lo que permite su separación (Figura 37). Los Orbitraps no solo tienen una alta precisión en la selección de masas, sino también un alto

poder de resolución y un alto margen dinámico. Debido a esto han revolucionado el campo de la espectrometría de masas [220].

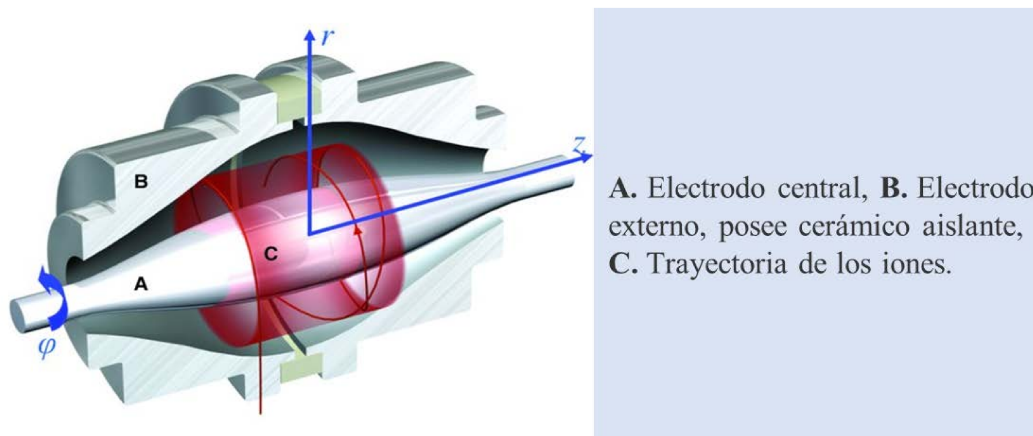


FIGURA 37. Sección de analizador Orbitrap. (Figura modificada de Scigelova y Makarov, 2006).

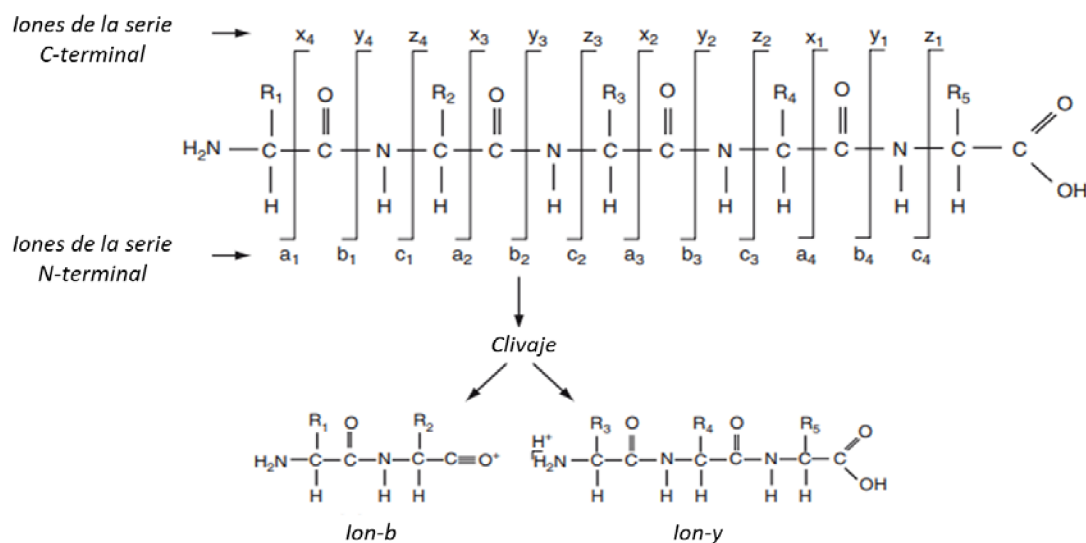
### Espectrometría de masas en Tándem (MS/MS)

La Espectrometría de Masas en Tándem (o MS/MS), consiste en dos etapas consecutivas de análisis de masa (mediante el acoplamiento de dos analizadores diferentes o iguales). Esta es utilizada para la detección de fragmentos de iones secundarios, los cuales son formados a partir de un ion precursor en particular. La primera etapa de análisis de masas (MS) sirve para aislar el ion precursor de interés basado en su relación de  $m/z$ , y la segunda etapa (MS/MS) analiza la masa de los iones formados por la fragmentación, inducida o espontánea, del ion precursor. La interpretación de este tipo de espectros es capaz de proveer información acerca de la secuencia de las moléculas [221-222]. Es por esto, que el uso combinado de analizadores en tándem permitió que surja rápida y eficazmente la posibilidad de determinar el peso molecular de una biomolécula intacta, mediante la fragmentación del ion molecular de la biomolécula y la fragmentación selectiva de los iones primarios formados. De esta manera, desde sus inicios, el ESI-MS-MS se pudo utilizar para la determinación tanto de pesos moleculares, como la estructura química de una molécula y también para su secuenciación [219]. En el análisis de proteínas y polipéptidos, el estudio de la fragmentación de los distintos iones formados permite determinar la estructura primaria o secuencia de los aminoácidos que las constituyen [223]. Los equipos de ESI-MS-MS actuales otorgan gran sensibilidad, resolución y exactitud; permitiendo realizar un amplio espectro de análisis, siendo el pilar fundamental de la proteómica, y jugando un rol fundamental en las ciencias biológicas.

## Proteómica y Secuenciamiento de novo

En los experimentos de proteómica, las proteínas son primeramente digeridas por proteasas, comúnmente mediante la utilización de la enzima tripsina, y luego los péptidos resultantes son analizados mediante MS. En estos estudios, primeramente, se determinará la masa de los iones peptídicos intactos, para luego seleccionar iones precursores específicos, que serán fragmentados para la posterior determinación de su relación m/z. El análisis detallado de los iones producidos dará información sobre la secuencia del péptido, que posteriormente llevará a la identificación de la proteína. Este tipo de estrategia es conocida como Proteómica *Bottom-up* [224].

La forma más común de fragmentación es la disociación inducida por colisión (en inglés, *collisional-induced dissociation* o CID). La CID, resulta en la formación preliminar de iones de la serie “b” e “y” a partir del ion precursor. Estos iones son formados a través del clivaje al azar de los enlaces peptídicos, donde los *iones-b* son serie de iones N-terminal, y los *iones-y* son C-terminal (Figura 38). Un típico espectro MS/MS contiene iones de ambas series (b e y). Existen características en los fragmentos de los iones de las series b e y que proporcionan información para la identificación de péptidos. Como ejemplo, los iones de las series b e y perderán una molécula de amoníaco si corresponden a residuos de R, K, Q ó N, y perderán una molécula de agua en los residuos S, T, E y D [225].



**FIGURA 38.** Esquema de formación de los iones tipo b e y a partir del clivaje de un pentapéptido. Los iones a, b o c se encuentran cargados en el N-terminal. Los iones x, y o z se encuentran cargados en el C-terminal (Figura generada con el software ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft)).

Los espectrómetros de MS/MS modernos poseen la capacidad de generar miles de péptidos en un solo experimento, con una eficiencia sin igual. Pero junto con la generación espectral viene el requisito de determinar con precisión la secuencia e identificar los péptidos presentes en una muestra [226]. En los primeros experimentos de proteómica, la identificación peptídica se realizaba manualmente, debido a la ausencia de softwares para la interpretación automatizada. Hoy en día se cuenta con plataformas de softwares capaces de realizar el análisis de datos utilizando algoritmos altamente sofisticados, y esquemas de puntuación [227].

En la proteómica, mayoritariamente, la identificación de secuencias se da a través de la comparación de los espectros de MS experimentales obtenidos, contra bases de datos, tanto de espectros como de genomas [228]. Pero existen muchos casos en los cuales el genoma del organismo no es conocido, y se debe trabajar de manera independiente de las bases de datos, dando origen al secuenciamiento *de novo*. Con este fin, se han desarrollado algoritmos que usan esquemas de puntuación otorgando puntajes basados en la identificación de los iones de diagnóstico mencionados anteriormente, es decir, series de iones *b* e *y*, así como también la información referida a cada residuo, como ser la presencia de amoníaco, iones de iminio y pérdidas de agua. La capacidad del software para derivar una secuencia de un espectro MS/MS depende de muchos factores, como la precisión y resolución de masas del instrumento, así como la calidad espectral. Uno de los programas actualmente más utilizados de secuenciamiento *de novo* es el Peaks Studio [229].

## La Espectrometría de Masas para el mapeo y secuenciamiento de péptidos a partir de extractos crudos

Debido a su complejidad y diversidad, las secreciones de animales representan una gran fuente de compuestos bioactivos. Los enfoques convencionales para su caracterización usualmente requieren grandes cantidades de material biológico. Hoy en día, gracias a los avances en las técnicas de MS, es posible obtener un gran volumen de información en un período de tiempo muy pequeño, y con muy poca cantidad de muestra. Este enfoque es actualmente utilizado para el descubrimiento y determinación de las estructuras de compuestos naturales novedosos, que luego derivan en su síntesis química para evaluar su actividad funcional [29].

Para la caracterización de péptidos en muestras naturales se pueden usar diferentes tipos de espectrómetros de masas, cada uno de ellos nos permitirá acceder a una gran cantidad de información, desde simplemente las masas moleculares de los componentes, hasta las secuencias de las moléculas. Por ejemplo, un Cromatógrafo Líquido acoplado a un Espectrómetro de Masas, ESI, nos dará lo que se conoce como huella digital de la masa molecular (en inglés, *molecular mass fingerprint*) del extracto. Aplicado a venenos (o secreciones), esto ha logrado la rápida identificación de compuestos ya conocidos, así como también la caracterización estructural de compuestos nuevos. Por su parte, el secuenciamiento *de novo* mediante MS-MS ofrece un acceso rápido a las estructuras primarias parciales o completas de péptidos [137].

## II.2. Análisis computacional de las secuencias

### Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias es una herramienta extraordinariamente útil para el descubrimiento de información funcional, estructural y evolutiva de secuencias biológicas. Este se basa en la comparación de secuencias de aminoácidos, de ADN o de ARN, con el fin de conocer su similitud e inferir la homología. Normalmente dos secuencias que poseen una alta similitud son consideradas homólogas; es decir que comparten un ancestro común. A partir de la similitud de las secuencias inferimos la homología. Cabe mencionar, que a diferencia de la similitud que es un término numérico cuantitativo, la homología no lo es. La homología posee un carácter de tipo cualitativo, dos secuencias o son homólogas (derivan del mismo ancestro), o no lo son. A lo largo de la historia, con el fin de lograr comparaciones efectivas y obtener resultados con diferentes utilidades en el ámbito del análisis de datos de secuencias, se han ido desarrollando diversas metodologías de alineamiento. De manera general, los alineamientos de secuencias se realizan superponiendo una secuencia sobre las demás y evaluando las coincidencias; en caso de ser necesario se insertan *gaps* o espacios para que las demás zonas con idéntica o similar estructura se alineen (Figura 39). A cada emparejamiento o *match* se le asigna un puntaje numérico o valor de *score*, siendo este mayor para aminoácidos iguales, y menor para aminoácidos diferentes o cuando se deben insertar *gaps* [230].



**FIGURA 39.** Ejemplificación de emparejamiento de dos secuencias sin alinear y alineadas. En celeste se denotan secuencias iguales alineadas, mientras que (—) representa los *gaps* incluidos en el alineamiento.

Se han diseñado diversas matrices a modo de algoritmos para realizar la puntuación y calcular los valores de *score* para los alineamientos. Las más utilizadas para alineamientos de aminoácidos son las matrices de sustitución PAM y BLOSUM. Las matrices PAM (en inglés, *Point Accepted Mutation*), fue desarrollada por Margaret Dayhoff en los años 70' [231]. Estas matrices se calculan observando las diferencias en proteínas cercanamente relacionadas, con un mínimo de similitud del 85 %. Por ejemplo, la matriz PAM 1 estima que ritmo de sustitución debería esperarse si el 1 % de los aminoácidos de las secuencias han cambiado. La matriz PAM 1 se utiliza como patrón del cálculo para las demás matrices PAM, asumiendo que las demás mutaciones seguirán el mismo patrón que esta, y que múltiples mutaciones pueden darse en el mismo sitio. Se encuentran matrices PAM tan altas como la PAM 250. No obstante, las matrices PAM han demostrado no trabajar muy bien para especies divergentes evolutivamente [232]. Para contrarrestar las problemáticas de las matrices PAM, Henikoff y col., construyeron matrices usando alineamientos múltiples de proteínas evolutivamente divergentes y desarrollaron las matrices BLOSUM (en inglés, *Block Sustitution Matrix*) [233]. Las probabilidades utilizadas en los cálculos de las BLOSUM se computan observando “bloques” de secuencias conservadas dentro del análisis de múltiples alineamientos de proteínas. Se asume que estas zonas de secuencias conservadas son de importancia funcional dentro de las proteínas relacionadas. Para reducir el sesgo debido a las secuencias cercanamente relacionadas, los segmentos de cada bloque fueron agrupados teniendo en cuenta una identidad de secuencia por encima de un determinado umbral. Para las matrices BLOSUM 62, este umbral se fijó en el 62 % [233]. Como guía se dice que matrices BLOSUM de numeración alta, se utilizarán para alinear dos secuencias cercanamente relacionadas, mientras que números más bajos se utilizarán para secuencias más divergentes. Se ha comprobado que la matriz BLOSUM 62 hace un excelente trabajo detectando similitudes en secuencias distantes (Figura 40), y esta es la matriz usada por defecto en las más recientes plataformas de alineamiento, como BLAST.





tridimensionales. Estos métodos parten de la asunción de que la información necesaria para conocer la estructura tridimensional de una proteína está en su secuencia de aminoácidos. De modo general, los algoritmos buscan una estructura que mejor represente a la proteína basándose en mínimos de energía global de una función de potencial. Para optimizar la función potencial se emplean distintos métodos de búsqueda en el espacio de las conformaciones, los cuales suelen implementar algoritmos de mecánica molecular combinados con dinámica molecular [235], simulaciones Monte Carlo (*Combination, Rosseta*) [236], o el empleo de bases de datos de elementos de estructura secundaria estándar (FRAGFOLD) [237].

Otro tipo de modelado estructural, el cual requiere menor costo informático que los anteriormente mencionados, y que ha demostrado buena tasa de éxito, es el modelado por homología (en inglés, *Homology Comparative Modelling*). La idea básica de la que surge esta aproximación descansa en el hecho de que todas las parejas de proteínas que presentan una identidad de secuencia mayor al 30% tienen una estructura tridimensional similar [238]. De este modo se puede construir el modelo tridimensional de una proteína de estructura desconocida, partiendo de la semejanza de secuencias con proteínas de estructura conocida [239].

Los métodos *ab initio* o *de novo* son computacionalmente costosos y su fiabilidad disminuye con el tamaño de la proteína. Sin embargo, estos métodos *de novo* han demostrado funcionar muy bien para la predicción de péptidos menores a 150 aminoácidos. La principal ventaja que tienen es que sólo se necesita la secuencia como información de partida, de modo que es posible modelar secuencias que corresponden a plegamientos no conocidos [235].

Existe una gran variedad de programas para realizar predicciones tridimensionales de la estructura de proteínas y péptidos. El servidor web PEP-FOLD permite predecir la estructura de secuencias peptídicas mediante métodos *de novo*. Los análisis mediante PEP-FOLD permiten realizar el modelado de péptidos lineales de entre 9 a 36 aminoácidos, y además acepta péptidos cíclicos con enlaces disulfuro. Los algoritmos utilizados por el PEP-FOLD se encuentran basados en cadenas ocultas de Markov y alfabeto estructural (SA-HMM) en combinación con un algoritmo codicioso y un campo de fuerza de grano grueso [240]. Recientemente el software, adicionó un mejoramiento

en las simulaciones para la predicción de la estructura secundaria de péptidos, permitiendo que estas sean llevadas a cabo en solución acuosa, aportando un entorno más adecuado en este tipo de estudios [241].

# CAPÍTULO II

## Objetivos

Purificación y análisis  
peptidómicos de los extractos de  
*B. cordobae* y *P. minuta*

Lic. Roque Spinelli

## II: OBJETIVOS

### GENERALES

- Realizar la purificación y el secuenciamiento peptídico de los extractos de anfibios que resultaron de mayor actividad biológica frente a las diferentes vías de la Enfermedad de Alzheimer.

### ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo la purificación mediante cromatografía líquida HPLC de los extractos de mayor bioactividad.
- Evaluar las actividades biológicas de las fracciones purificadas a modo de seleccionar aquellas de mayor interés.
- Realizar análisis proteómicos de secuenciamiento *de novo* mediante espectrometría de masas en tándem ESI-MS-MS de las fracciones más activas.
- Estudiar de modo *in silico* las secuencias identificadas a fin de conocer sus características fisicoquímicas.
- Realizar el modelado molecular de las estructuras secundarias para las secuencias identificadas.

# CAPÍTULO II

## Materiales y Métodos

Purificación y análisis  
peptidómicos de los extractos de  
*B. cordobae* y *P. minuta*

Lic. Roque Spinelli

## II: MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Purificación de los extractos mediante RP-HPLC semipreparativa

Los extractos completos de las especies *B. cordobae* y *P. minuta* fueron purificados mediante HPLC en fase reversa, a través de la utilización de un equipo Waters 1525 (USA) y una columna semipreparativa ZORBAX 300SB C8 Agilent (USA), de 5  $\mu\text{m}$ , 9,4 x 250 mm. Se empleó el siguiente sistema de solventes, Solventes A: agua Milli-Q con 0,1 % de TFA, y Solvente B: ACN con 0,08 % de TFA. La detección fue realizada con un detector Waters 2489 (USA) a 220 nm. Se utilizó un gradiente de elusión de 5 % de ACN durante 5 min, de 5 al 80 % hasta los 30 min, y finalmente, se mantuvo al 80 % durante 3 min. El flujo utilizado fue de 3 ml/min. La recolección de las fracciones purificadas fue realizada de forma manual a través del seguimiento de las absorbancias.

### II.2. Actividad enzimática de los purificados frente a las colinesterasas

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de las fracciones purificadas de *B. cordobae* y *P. minuta* frente a AChE y BChE se procedió de igual manera que lo descrito en el Capítulo I (Ver Sección I.6.1, Materiales y Métodos - Capítulo I), utilizándose el ensayo de Ellman con pequeñas modificaciones [147].

### II.3. Cromatografía líquida acoplada a electroarray y espectrometría de masas en tándem (nanoHPLC-ESI-MS/MS)

Para los estudios de ESI-MS/MS se utilizó un Cromatógrafo líquido nanoAcquity (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Para ello, 5  $\mu\text{g}$  de las muestras suspendidas en ácido fórmico al 1 % fueron inyectadas para la separación cromatográfica en una columna C18 (BEH Waters, 75  $\mu\text{m}$  x 10 cm, 1.7  $\mu\text{m}$ ). Los solventes de corrida fueron los siguientes, Solventes: A: 0,1 % ácido fórmico en agua; Solvente B: 0,1 % ácido fórmico en ACN. El gradiente utilizado fue del 1 al 40 % B en 20 min, seguido del 40 al 60 % B en 5 min, a un flujo de 250 nl/min. Posteriormente, los péptidos eluidos fueron ionizados aplicando un potencial eléctrico a

una aguja nano-ES (pico Tip TM, New Objective). El voltaje aplicado fue de 1,9-2,1 kV. Las masas de los péptidos se midieron en el método Full Scan MS (en el Orbitrap con una resolución de 60.000 FWHM a 400 m/z). Los 5 péptidos más abundantes (intensidad mínima de 3000 cuentas) se seleccionaron en cada análisis de MS para su fragmentación en la trampa HCD (en inglés, *Higher Energy Collision Induced Dissociated*), utilizando helio como gas de colisión, y una energía de colisión normalizada del 40 %. Los datos fueron adquiridos mediante el software Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140) en formato de *raw data*.

## Estudios de novo de los resultados obtenidos por ESI-MS/MS

Para la realización del análisis *de novo*, los ficheros de tipo *raw data* obtenidos, fueron primeramente convertidos a ficheros formato *mgf* mediante el software Proteome Discover (v.1.2.0.124). Posteriormente los datos fueron analizados con los softwares Peaks Studio v.5.2 y Peptide Sequencing, para la obtención de las secuencias *de novo*. Los parámetros empleados fueron:

- Sin digestión enzimática
- Tolerancia de error del péptido: 10 ppm
- Tolerancia de error del fragmento: 0,1 Da
- Modificaciones variables: Met(Ox), metionina oxidada (+15,99 Da)

Aquellas secuencias con valores de *Score* menor al 80 % fueron descartadas.

Los análisis por Espectrometría de masas y el secuenciamiento *de novo*, fueron llevados a cabo en colaboración con el Prof. Dr. Fernando Albericio (Departamento de Química y Física de la Universidad de Kwazulu Natal - Sudáfrica) y las Dras. Eliandre de Olivera y Ma. Antonia Odena (Plataforma de Proteómica – Parque Científico de Barcelona – España).

## II.4. Análisis *in silico* de las secuencias identificadas

Diferentes herramientas computacionales fueron utilizadas para realizar estudios de caracterización fisicoquímicos, estructurales, así como también para obtener información evolutiva de las secuencias peptídicas obtenidas.

---

## Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos

El software Pepcalc – Innovagen (<https://pepcalc.com>) fue utilizado para obtener información sobre el peso molecular de los péptidos. Por otro lado, mediante la utilización de la herramienta Protparam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) se estudiaron los siguientes parámetros fisicoquímicos de las secuencias:

- Punto isoeléctrico (PI)
- Índice GRAVY (en inglés, *Grand Average of Hydropathy*), da información acertada sobre la hidrofobicidad de la secuencia, confiriéndole a cada residuo un valor de hidrofobicidad basado en la escala de Eisenberg y calculando los valores de hidrofobicidad como la suma de todos los valores de los aminoácidos dividida por el número de residuos en la secuencia. Cuanto mayor sea el valor H, más hidrofóbico será el péptido [242].

Con el uso de la herramienta HLP (en inglés, *Half Life Prediction*) (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/>) [243], se calculó la estabilidad de los péptidos en un ambiente proteolítico intestinal según su vida media.

## Análisis comparativos como péptidos reportados

Con el fin de evaluar la novedad de los péptidos identificados, se realizó un estudio computacional comparativo mediante el alineamiento de las secuencias obtenidas frente a secuencias previamente reportadas en la base de datos de la *Antimicrobial Peptide Data Base* (APDB) (<http://aps.unmc.edu/AP>). La APDB es una base de datos específica de péptidos con actividad biológica [244].

## Predicción de la estructura secundaria de los péptidos identificados

Para predecir la estructura de los péptidos se utilizó el servidor en línea PEP-FOLD 3.5 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>). Se utilizaron 100 simulaciones y un ordenamiento de modelos sOPEP [241]. Aquellos *cluster* de mejor energía fueron seleccionados. La visualización de las estructuras fue llevada a cabo mediante el software Discovery Studio Visualizer 2017 (Biovia). Los porcentajes de  $\alpha$ -hélices de las secuencias fueron calculados observando la estructura molecular predicha por el servidor PEP-FOLD 3.5.



## Estudios evolutivos de los péptidos

Se realizó el análisis de la identidad de secuencia entre los péptidos aislados dentro de las mismas fracciones purificadas, a fin de establecer una similitud evolutiva entre ellos. Para ello, se utilizó el servidor en línea BLAST Protein (en inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) perteneciente al NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas de cada fracción mediante una matriz BLASUM 62. Por otro lado, se utilizó el servidor COBALT (en inglés, *Constraint-based Multiple Alignment Tool*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) para realizar un árbol filogenético de los péptidos a fin de tener una visión más simplificada de la distancia evolutiva de cada uno de ellos.

# CAPÍTULO II

## Resultados y Discusiones

Purificación y análisis  
peptidómicos de los extractos de  
*B. cordobae* y *P. minuta*

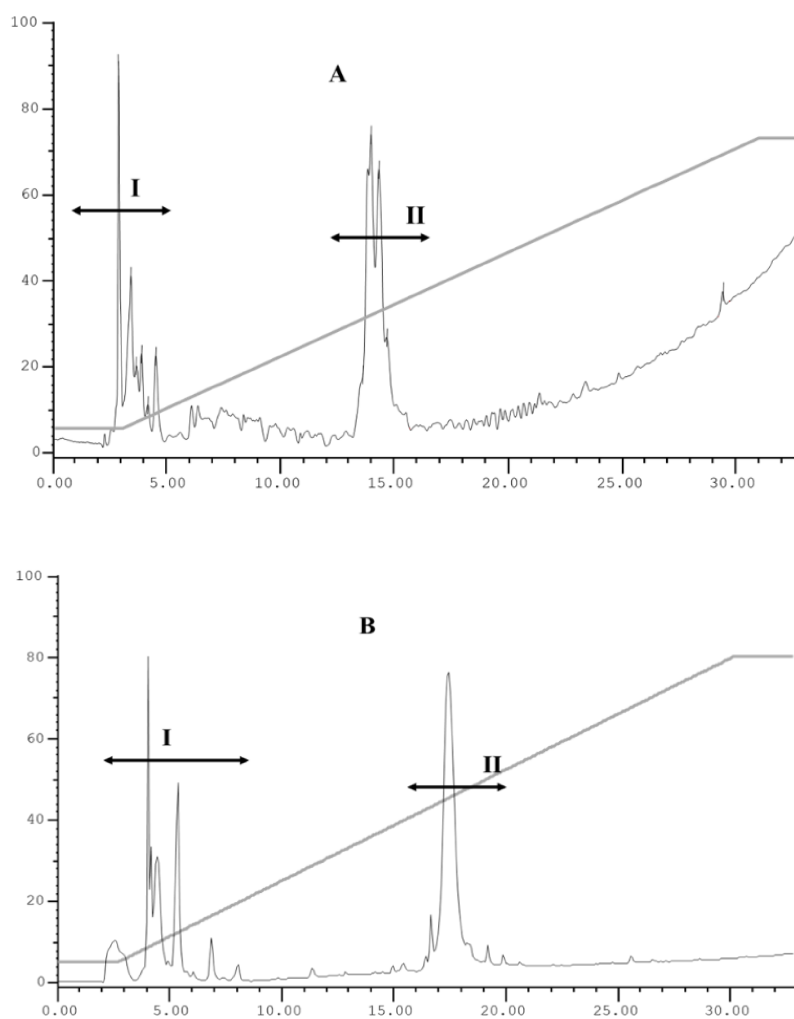
Lic. Roque Spinelli

## II: RESULTADOS Y DISCUSIONES

### II.1. Purificación de los extractos mediante RP-HPLC semipreparativa

En el primer capítulo se estudiaron los extractos de las pieles de cinco especies de anfibios pertenecientes a las familias Hylidae y Leptodactylidae, con el fin de evaluar su actividad como agentes moduladores de diferentes vías patológicas de la Enfermedad de Alzheimer.

*B. cordobae* y *P. minuta* (Anura: Hylidae) resultaron ser los más prometedores, mostrando la capacidad de inhibir tanto enzimas colinesterasas (AChE y BChE), como la MAO-B; además de poseer capacidad antioxidante y quelante. Con el objetivo de avanzar en el aislamiento de los compuestos activos presentes en los extractos mencionados, se realizó una purificación mediante HPLC en fase reversa semipreparativa. Se diseñó el esquema de purificación representado en la Figura 41, en donde para el extracto de *B. cordobae* se obtuvieron las fracciones BcI y BcII (Figura 41 A) y para *P. minuta* PmI y PmII (Figura 41. B).



**FIGURA 41.** Fraccionamiento mediante RP-HPLC C8 del extracto completo de las especies (A) *B. cordobae* y (B) *P. minuta*. Gradiente lineal (5 a 80 %) de solución A (0,1 % TFA en agua) a solución B (0,1 % TFA en ACN) por 33 min. Flujo de 3 ml/min. Detección 220 nm.

## II.2. Actividad inhibitoria de los purificados frente a AChE y BChE

La Tabla 7 muestra los resultados de actividad inhibitoria expresados como IC50 para las fracciones purificadas de ambos extractos.

Para *B. cordobae*, de las dos fracciones obtenidas; BcI resultó activa frente a ambas enzimas estudiadas, mientras que la BcII solo mostró inhibición frente a AChE. Por otro lado, de las fracciones de *P. minuta*, solamente PmII presentó actividad inhibitoria, resultando activa frente a ambas enzimas colinesterasas.

**TABLA 7.** Resultados de actividad inhibitoria de las fracciones purificadas frente a AChE y BChE expresado como IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Especie	Fracciones	Tr (min) <sup>(a)</sup>	% ACN	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>(b)</sup>	
				AChE	BChE
<i>B. cordobae</i>	BcI	0 – 5	0-5	324 $\pm$ 12	285 $\pm$ 2
	BcII	13 – 16	35-40	676 $\pm$ 33	<800
<i>P. minuta</i>	PmI	0 – 5	0-5	NI	NI
	PmII	14 – 16	30-40	407 $\pm$ 8	511 $\pm$ 19

<sup>(a)</sup> Tr: tiempo de retención cromatográfica expresados en minutos. <sup>(b)</sup> Los valores de IC50 fueron determinados mediante el análisis de la regresión lineal de la determinación de tres replicas. Todos los valores fueron expresados con el 95 % de confianza. NI: no inhibe

Los resultados de inhibición obtenidos frente a las enzimas colinesterasas muestran que las fracciones de mayor interés para continuar con los estudios en profundidad son BcI y BcII de *B. cordobae* y PmII de *P. minuta*.

### II.3. Secuenciamiento peptídico *de novo* de las fracciones purificadas

Los análisis de secuenciamiento *de novo* de los péptidos presentes en las fracciones BcI y BcII de *B. cordobae* y PmII de *P. minuta* fueron llevados a cabo mediante espectrometría de masas nano HPLC-ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap).

El análisis proteómico completo logró identificar ciento treinta y cinco secuencias, siendo ochenta y tres para la fracción BcI; cuarenta para la fracción BcII de la especie *B. cordobae*; y doce para la fracción PmII de *P. minuta*. Dichas secuencias mostraron un rango valor de *score* global de confianza de entre el 70 y 90 %. Solo aquellas secuencias identificadas con un valor de *score* global de confianza mayor al 80 % fueron tenidas en cuenta. Este criterio lo cumplieron quince secuencias de la fracción BcI, y tres en la fracción BcII de *B. cordobae*. Mientras que solo una en la fracción PmII de *P. minuta*.

La Tabla 8, muestra la información correspondiente a las secuencias peptídicas obtenidas *de novo* para las fracciones estudiadas. Los péptidos fueron nombrados teniendo en cuenta la especie, la fracción a la cual pertenecen y la posición de *score* global de confianza. Por ejemplo, el péptido de mayor *score* identificado para la fracción BcI fue nombrado como BcI-1, y así respectivamente. Por otro lado, se nombró como “serie BcI” a los 15 péptidos identificados para la fracción BcI, “serie BcII” a los 3 péptidos

identificados para la fracción BcII; y “serie PmII” a la secuencia correspondiente a la fracción PmII.

Las secuencias fueron determinadas de manera automática mediante el empleo de los softwares Peptide Sequencing y Peaks Studio v.5.1, utilizándose predominantemente los iones *b* e *y*. En todos los casos el solapamiento de ambas series de iones (*b* e *y*) cubrieron el total de la secuencia reportada. Todas las secuencias fueron corroboradas manualmente. En las Figuras 42 a la 60 se presentan los análisis peptidómicos de los iones identificados mediante espectrometría de masas ESI-MS/MS.

Del análisis de los resultados de la Tabla 8 se pudo observar que para la serie BcI se obtuvieron secuencias de peso molecular experimental de entre 900 a 1500 Da, mientras que para la serie BcII de entre 900 a 1600 Da. En cuanto el péptido de PmII mostró una masa de 1172 Da. De la comparación de las masas moleculares obtenidas mediante ESI-MS/MS y los análisis por MALDI-Tof realizados frente a los extractos completos (ver Figuras 24 y 25, Capítulo I), se pudo observar lo siguiente: para *B. cordobae* en MALDI-Tof se evidenció un ion con relación de *m/z* de 1025 el cual correspondería a los péptidos BcI-4 y/o BcII-3; mientras que para *P. minuta* se pudo observar la presencia de un ion con *m/z* de 1482 el cual correspondería al péptido PmII-2 (de bajo *Score* global de confianza = 78 %) (ver Tabla A1, Material Anexo). Este hecho denota que ambas metodologías proporcionan datos diferentes. Un equipo de tipo ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap) logra no solo un gran poder resolutivo, y sensibilidad, al detectar componentes que se encuentran en muy pequeña proporción, sino que también brinda una mayor exactitud en el valor de las masas obtenidas; lográndose una caracterización de iones que no sería posible mediante el empleo de equipos tradicionales como MALDI-Tof. Sin embargo, un análisis mediante MALDI-Tof resulta útil como estudio preliminar, rápido y de menor costo para extractos completos de extrema complejidad como son las pieles de anfibios. Por otro lado, la aplicación de técnicas separativas como nanoHPLC previa al análisis por ESI-MS permite acceder a fracciones con un limitado número de componentes, lo que facilita su posterior identificación.

**TABLA 8.** Información de las secuencias de *B. cordobae* y *P. minuta* mediante el análisis proteómico del software Peaks Studio y ESI-MS-MS.

PM Experimental	Ión m/z <sup>(a)</sup>	Acrónimo	Secuencia	Nr	Carga Neta <sup>(b)</sup>	% Global Confianza	% Local de confianza <sup>(c)</sup>
<b>Serie BcI</b>							
1248,682	625,3529	BcI-1	GSKAFAALLESR	12	+2	90	88 87 85 81 85 99 100 99 92 87 93 78
1014,498	508,2542	BcI-2	DPKLEER	8	-1	90	88 88 96 96 96 91 91 70
1556,721	779,365	BcI-3	TPGHGAEYGAEALER	15	-1	88	79 82 93 98 95 96 100 99 98 98 98 83 68 85 49
1025,402	513,7136	BcI-4	RM(Ox)ACCCAPR	9	+3	85	95 85 72 73 62 100 98 98 87
1205,531	603,7709	BcI-5	DDDHSVYTR	10	-1	85	28 91 97 98 100 100 91 84 88 75
1091,608	546,8167	BcI-6	SGKAFAKEVR	10	+3	85	87 88 92 89 92 95 64 64 96 84
1195,583	598,7952	BcI-7	EADAAAGEPLPR	12	-1	85	85 87 88 98 99 97 90 86 76 74 87 55
1368,619	685,3177	BcI-8	TM(Ox)EVVDSAGTSTR	13	0	84	92 94 99 99 99 99 94 93 56 50 76 81 61
953,456	477,7335	BcI-9	DEDGHLR	8	-1	83	40 98 99 97 97 94 93 50
1509,778	755,8981	BcI-10	PSLGAEENQVLTPR	14	0	83	58 66 91 73 73 94 98 64 64 99 98 97 97 89
906,503	454,2596	BcI-11	GSRVFSVR	8	+3	82	81 84 89 89 72 85 94 62
1436,777	719,3994	BcI-12	PDGAPPPVHALKAA	15	+1	81	57 66 83 86 99 100 100 98 96 83 75 71 67 68 72
1202,677	602,3506	BcI-13	GSAFAAKLVSPR	12	+3	81	77 76 76 61 47 86 92 95 95 93 94 74
1190,677	596,3506	BcI-14	SGAAFALLKASR	12	+3	80	82 82 91 89 82 89 95 84 80 67 67 50
1003,559	502,7856	BcI-15	GSKKTKCPR	9	+5	80	78 79 92 73 77 69 65 96 90
<b>Serie BcII</b>							
931,454	466,7323	BcII-1	ASGM(Ox)LGPAGR	10	+2	86	87 89 97 94 79 78 81 77 82 96
1629,905	408,4852	BcII-2	QPPKTESAKSSKSK	15	+5	85	69 81 98 99 98 96 94 92 92 93 93 53 60 87 62
1025,525	513,7693	BcII-3	LAGPAGSRGGPS	12	+2	82	97 96 99 96 92 88 80 81 91 60 48 51
<b>Serie PmII</b>							
1172,440	587,2277	PmII-1	EHDGGYGEFY	10	-2	81	78 83 86 78 76 77 81 80 92 74

Secuenciamiento por ESI-MS-MS. <sup>(a)</sup> La carga de todos los iones fue +2. <sup>(b)</sup> Carga neta a pH:7. Nr: número de residuos. M(ox): metionina oxidada. <sup>(c)</sup> Porcentaje de confianza por aminoácido.

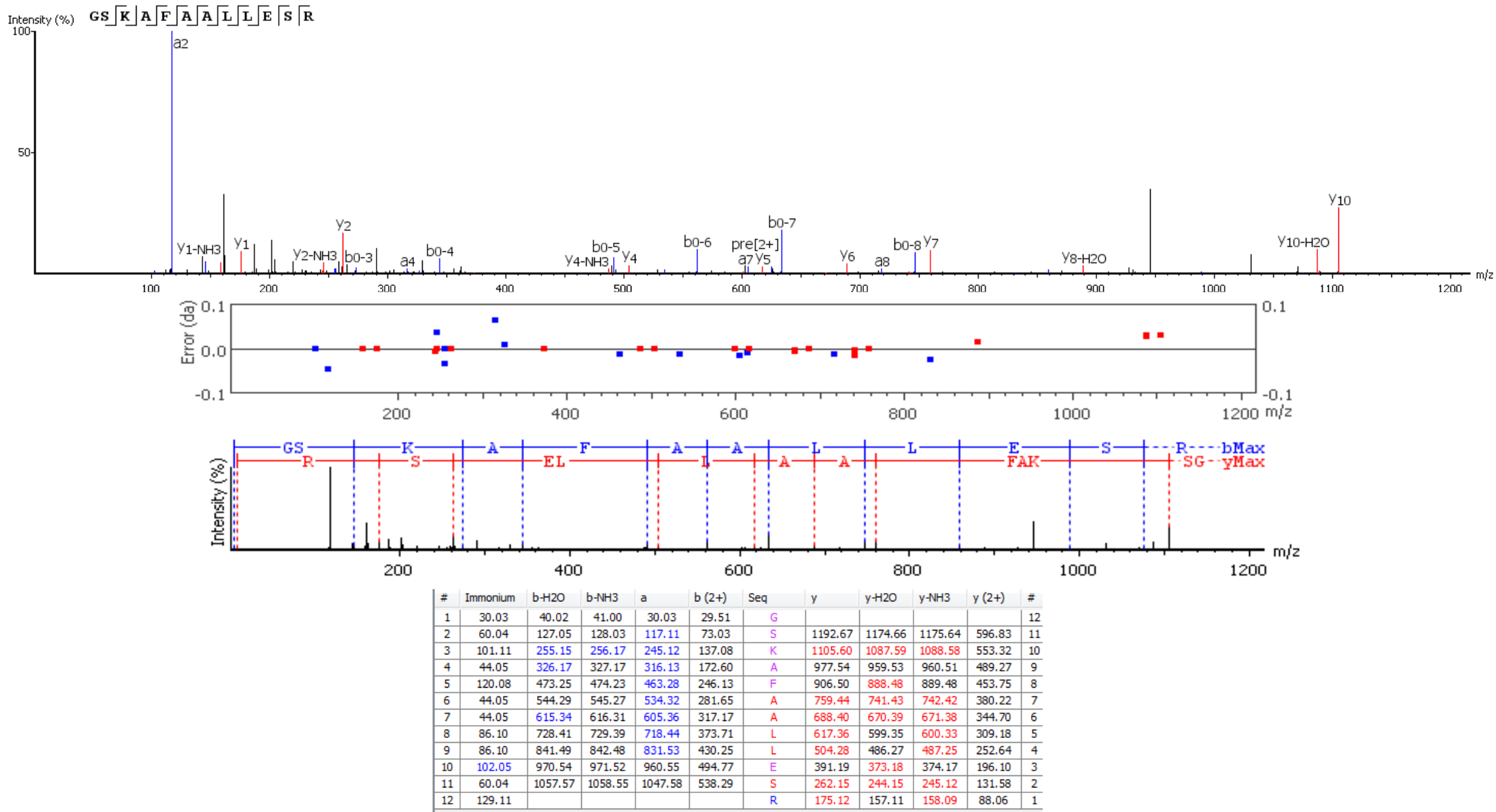


FIGURA 42. Análisis peptidómico del espectro de MS-MS del ion con carga +2, 625,3529 m/z. PM experimental: 1248,682 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).



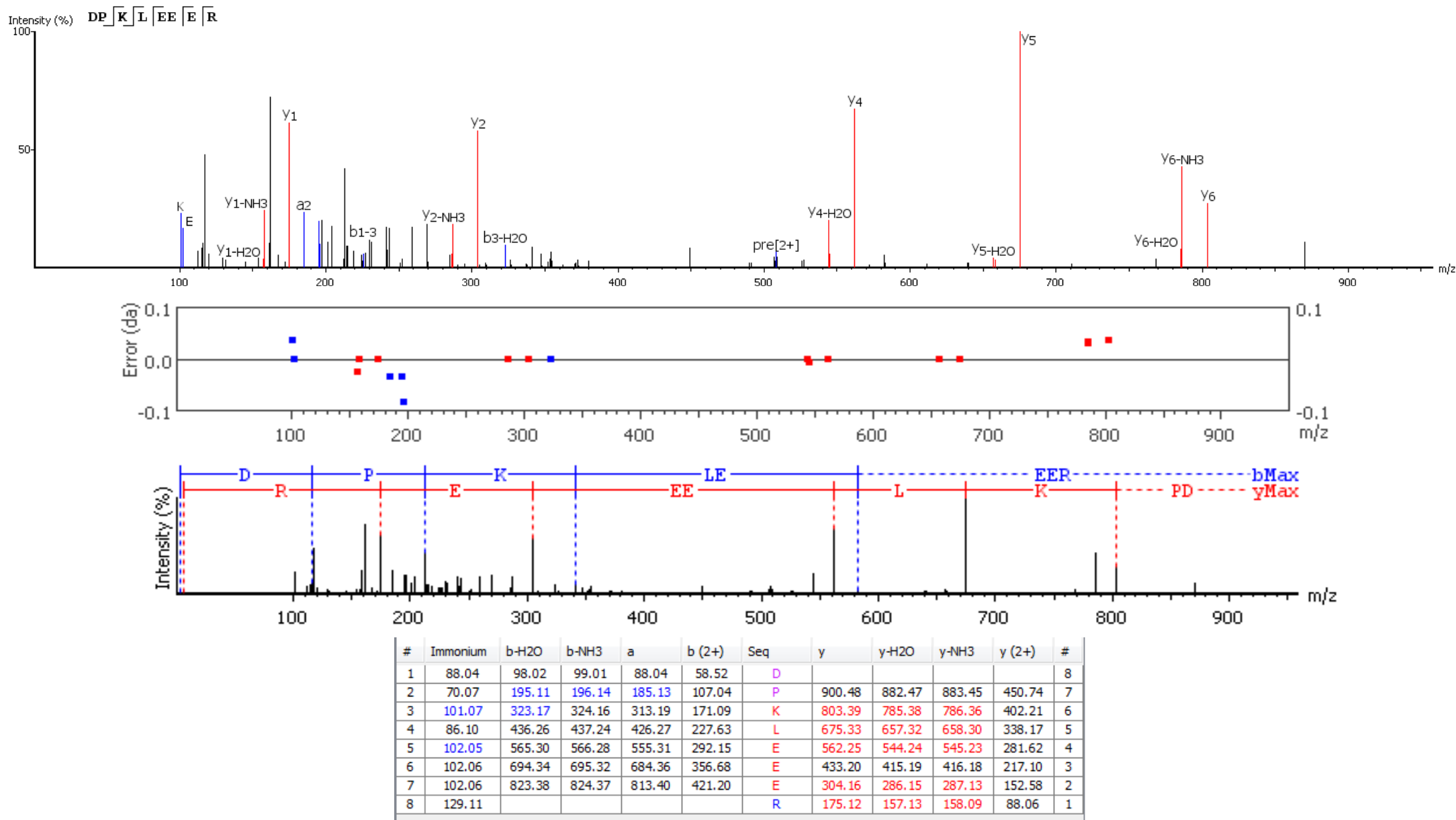


FIGURA 43. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 508,2542 m/z, PM experimental: 1014,498 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

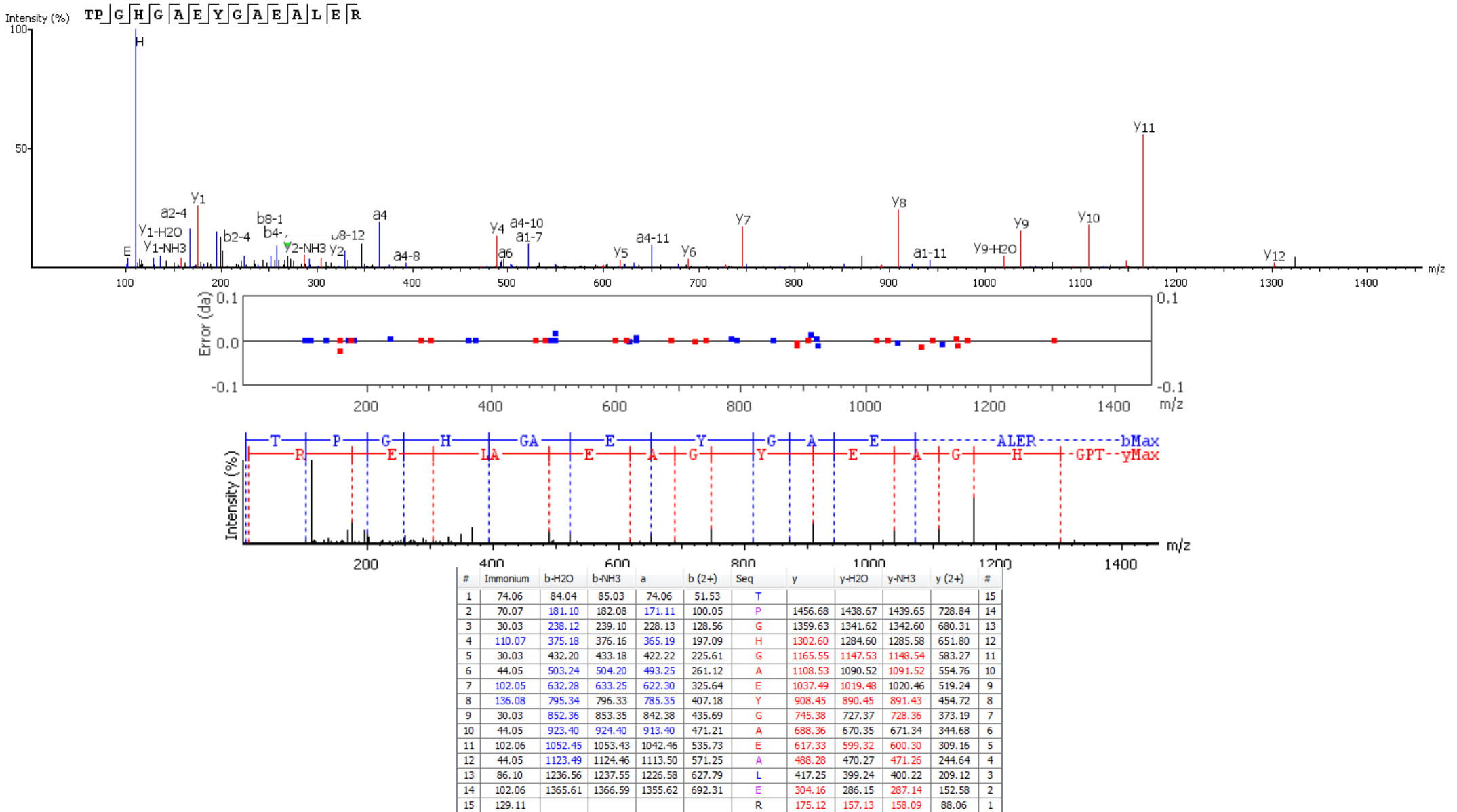
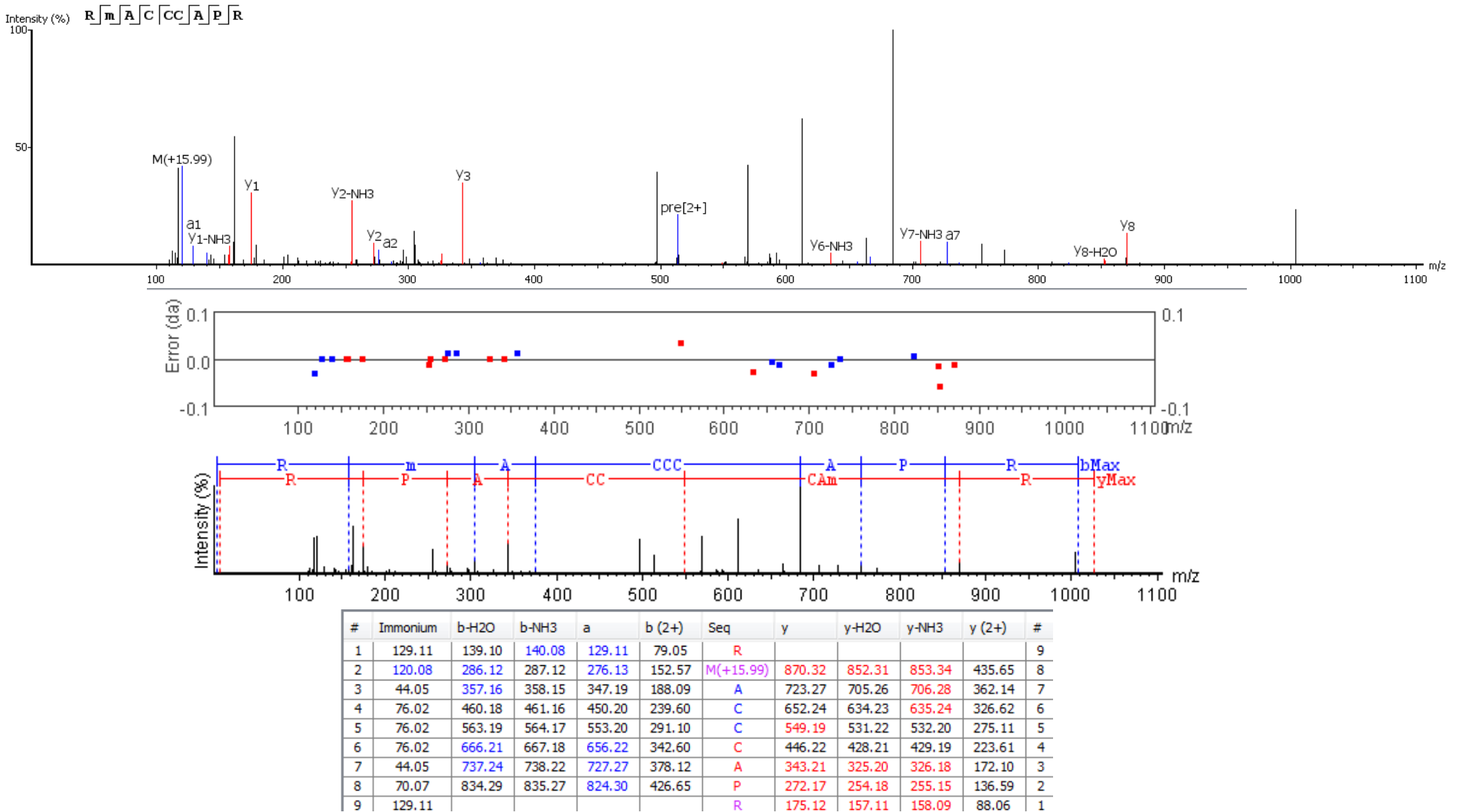


FIGURA 44. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 779,365 m/z, PM experimental: 1556,721 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).



**FIGURA 45.** Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 513,713 m/z, PM experimental: 1025,402 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida)

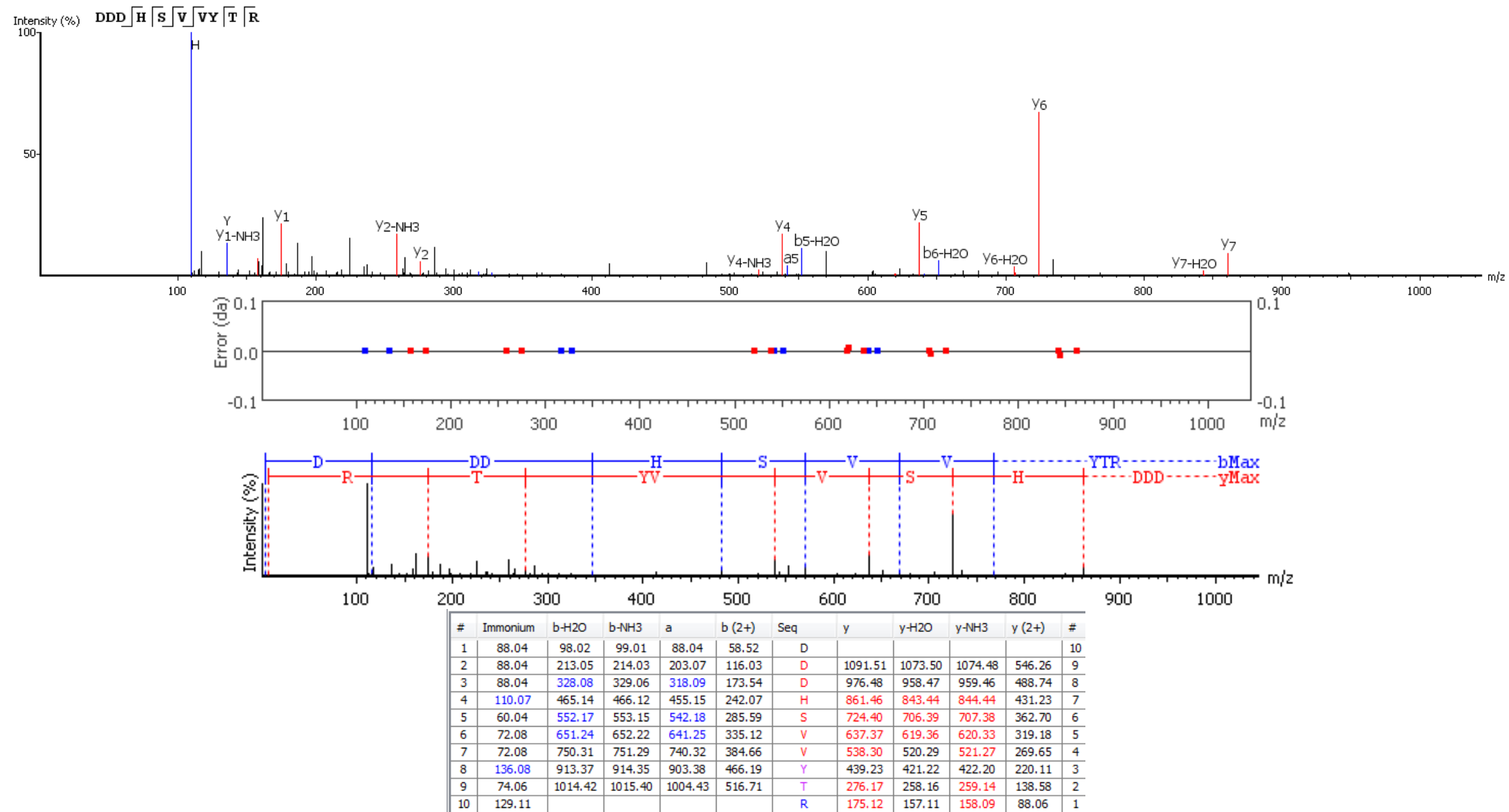
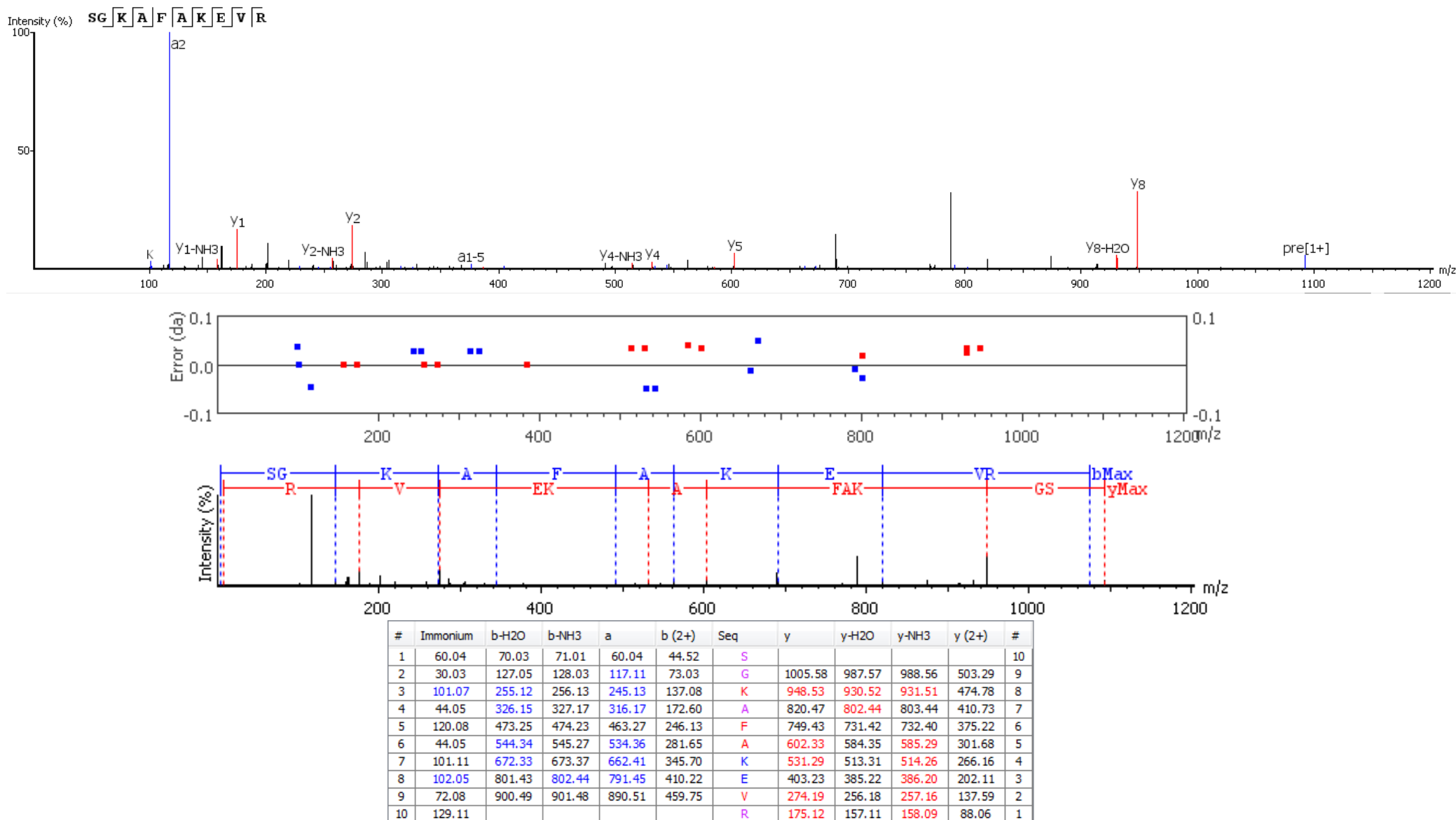


FIGURA 46. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 603,7709 m/z, PM experimental: 1205,531 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).



**FIGURA 47.** Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 546,8167 m/z, PM experimental: 1091,608 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

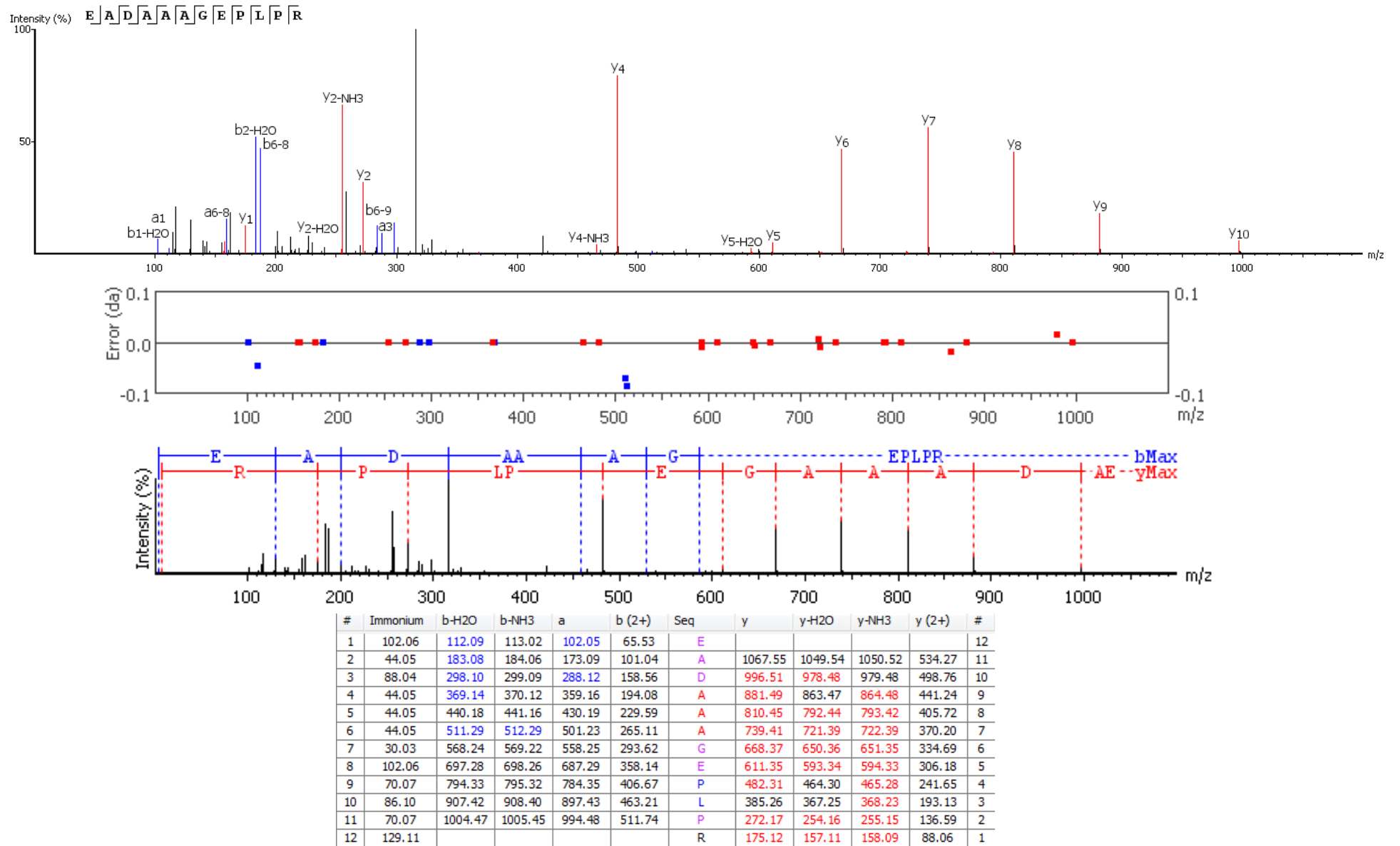


FIGURA 48. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 598,7952 m/z, PM experimental: 1195,583 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

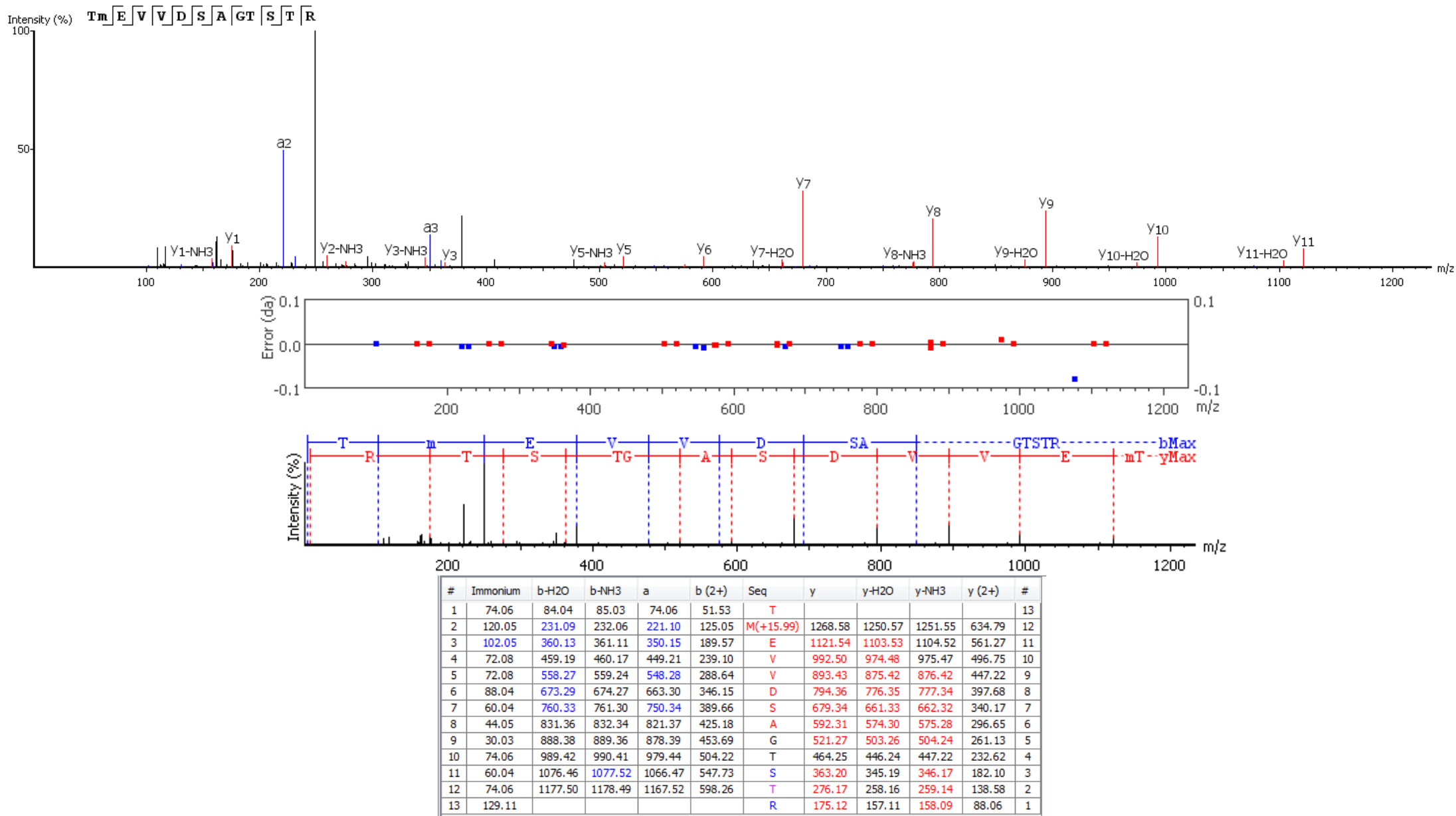


FIGURA 49. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 685,3177 m/z. PM experimental: 1368,619 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

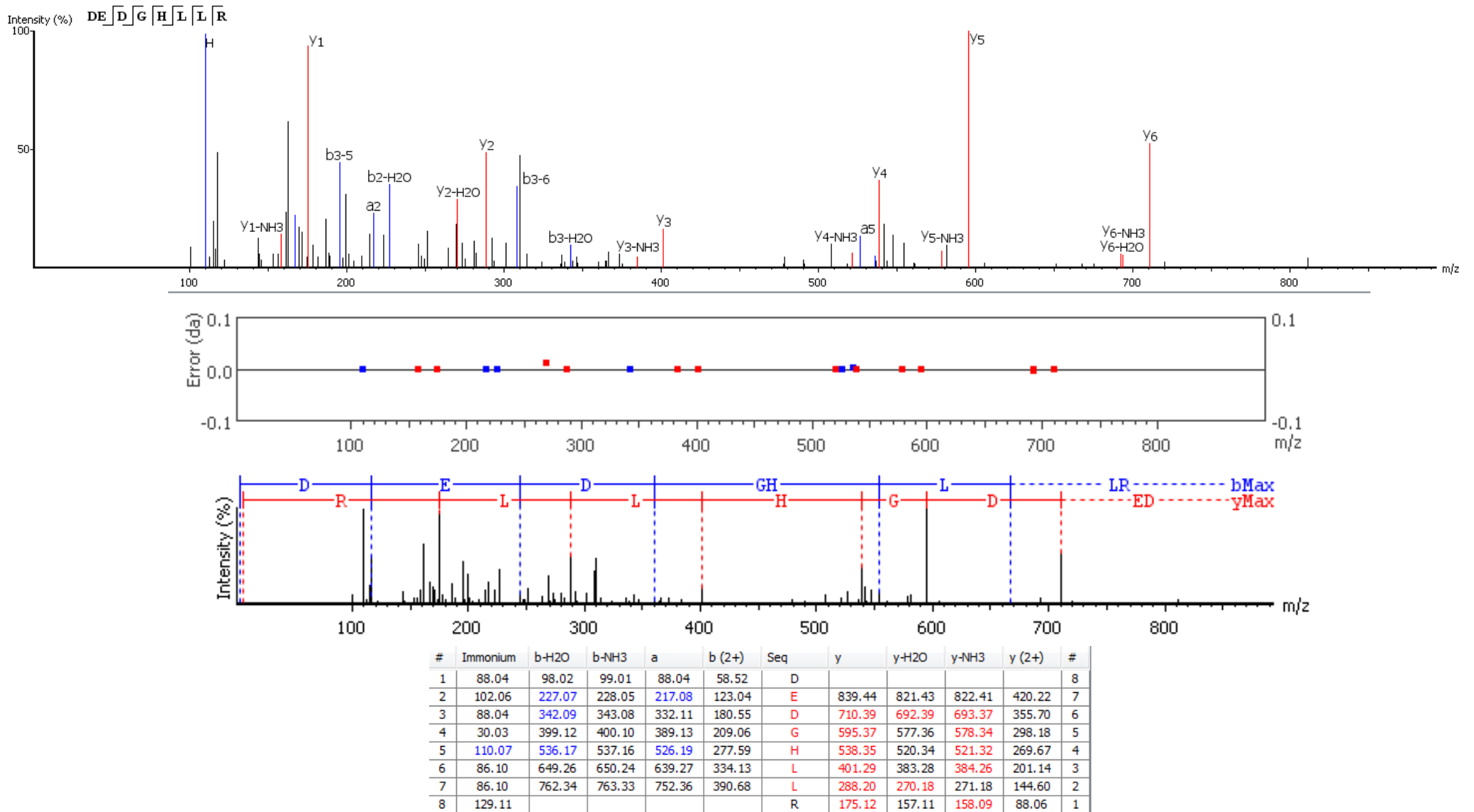


FIGURA 50. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 477,7335 m/z. PM experimental: 953,456 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).



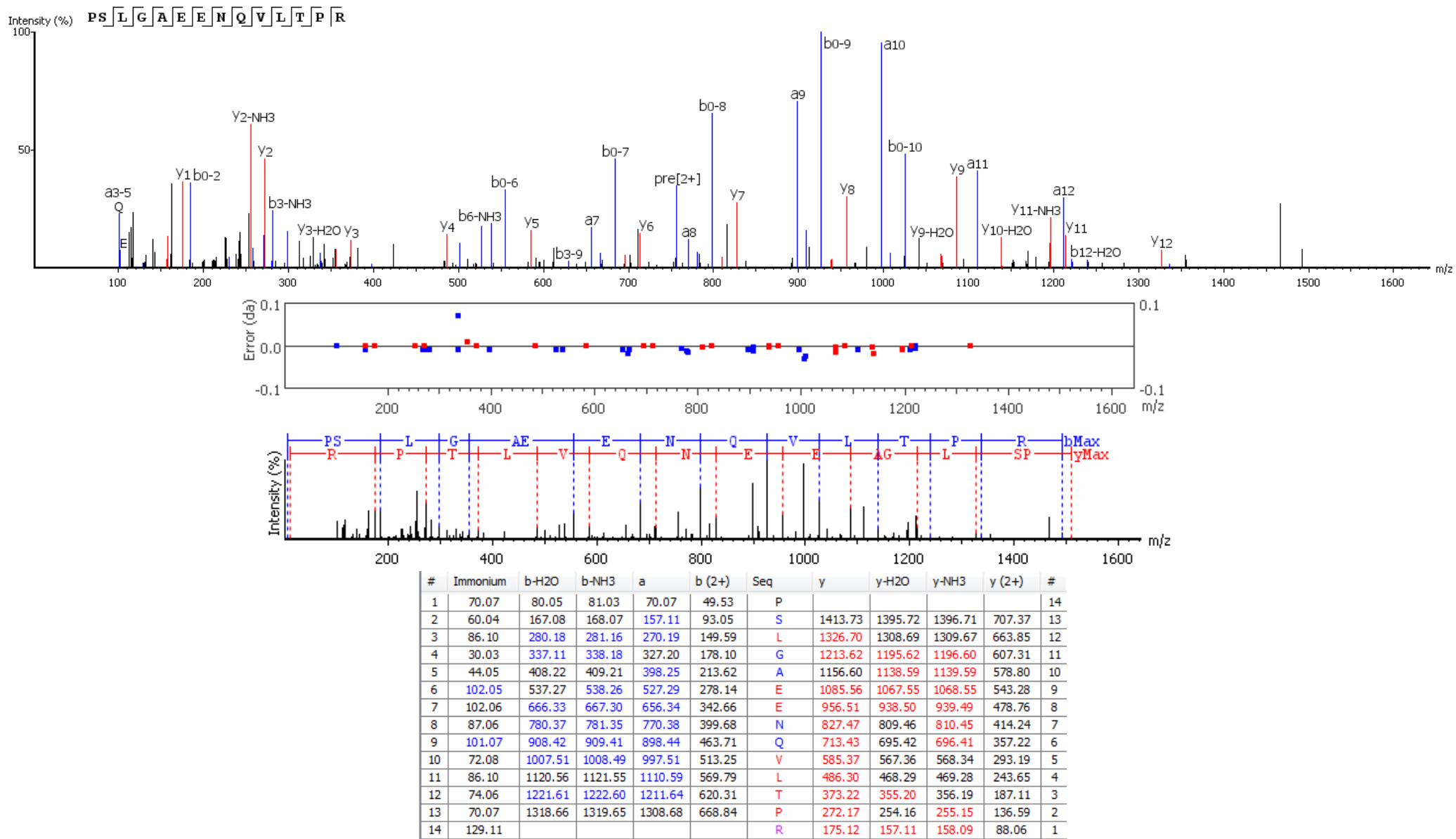


FIGURA 51. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 755,8981. PM experimental: 1509,778 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

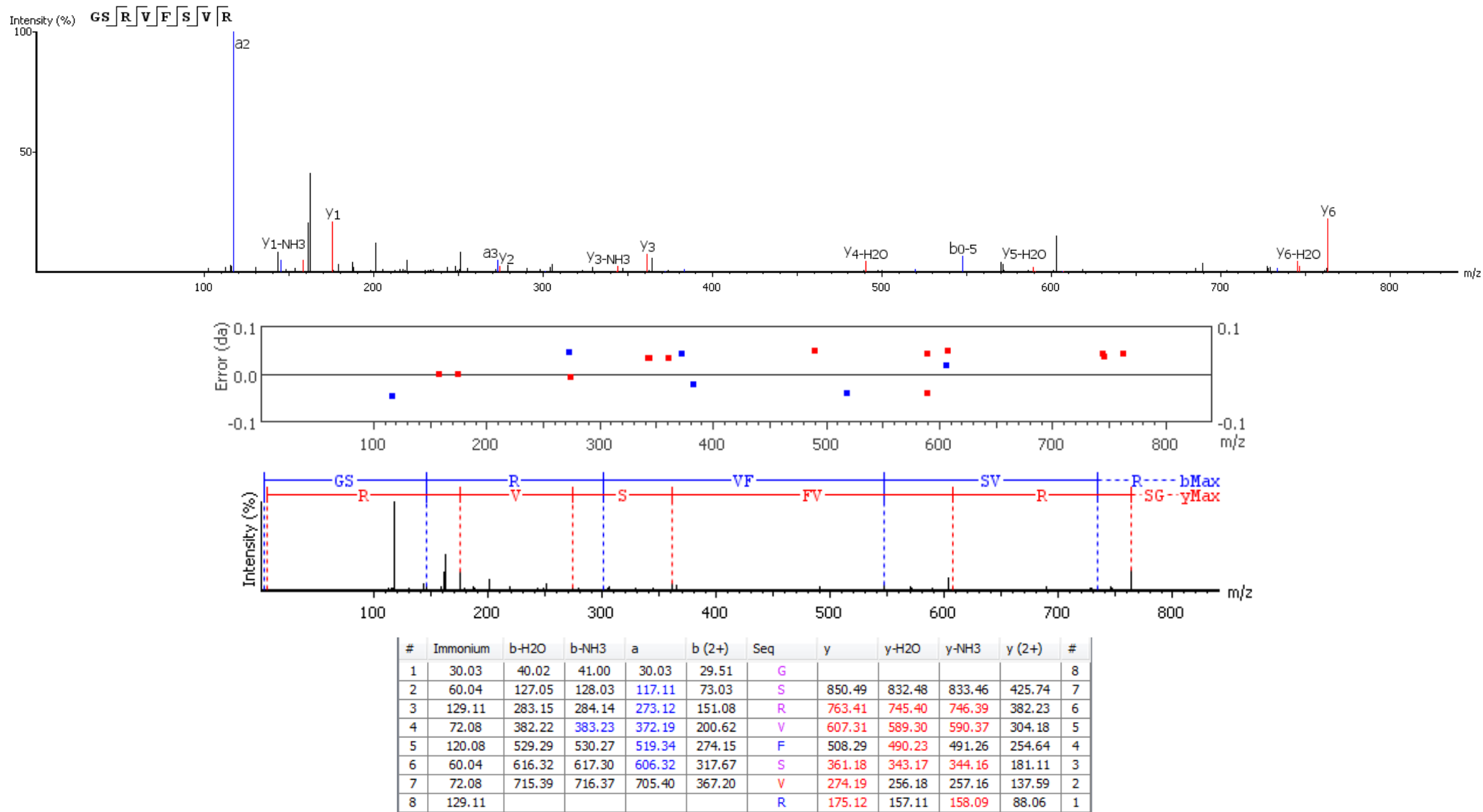


FIGURA 52. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 454,2596 m/z. PM experimental: 906,503 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

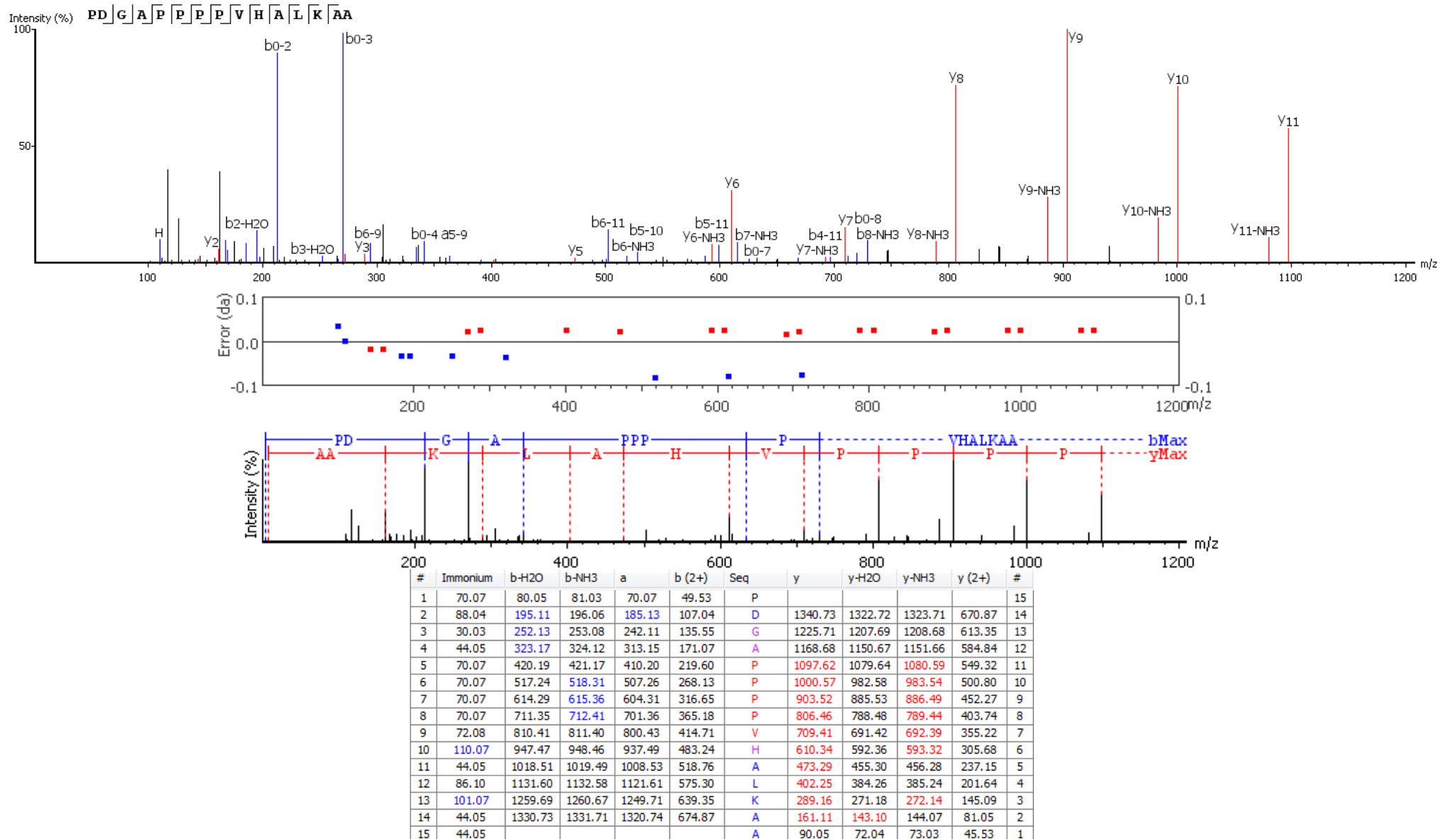


FIGURA 53. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 719,394 m/z. PM experimental: 1436,777 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

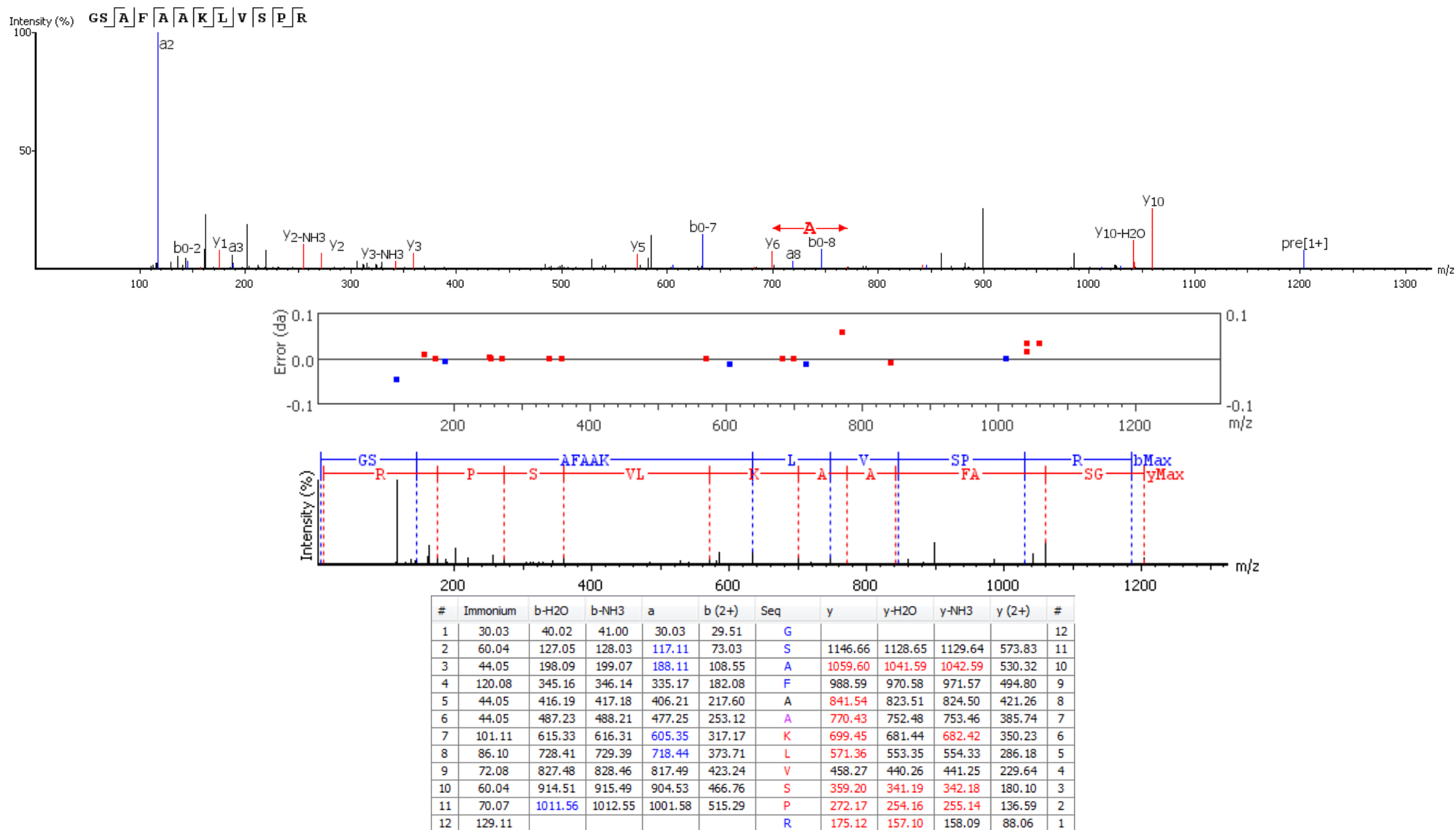


FIGURA 54. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 602,3506 m/z. PM experimental: 1202,677 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

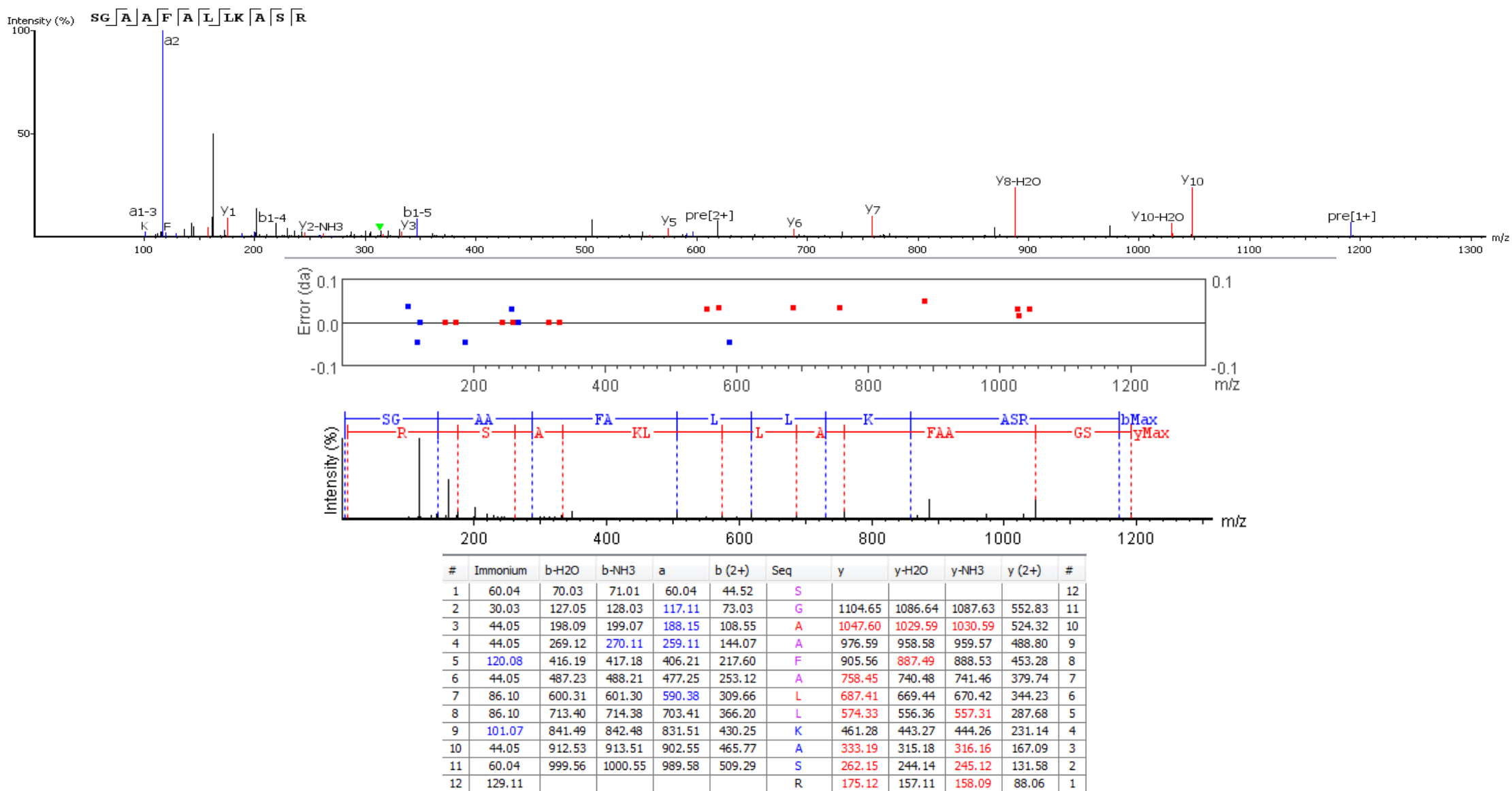


FIGURA 55. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 596,3506 m/z. PM experimental: 1190,677 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

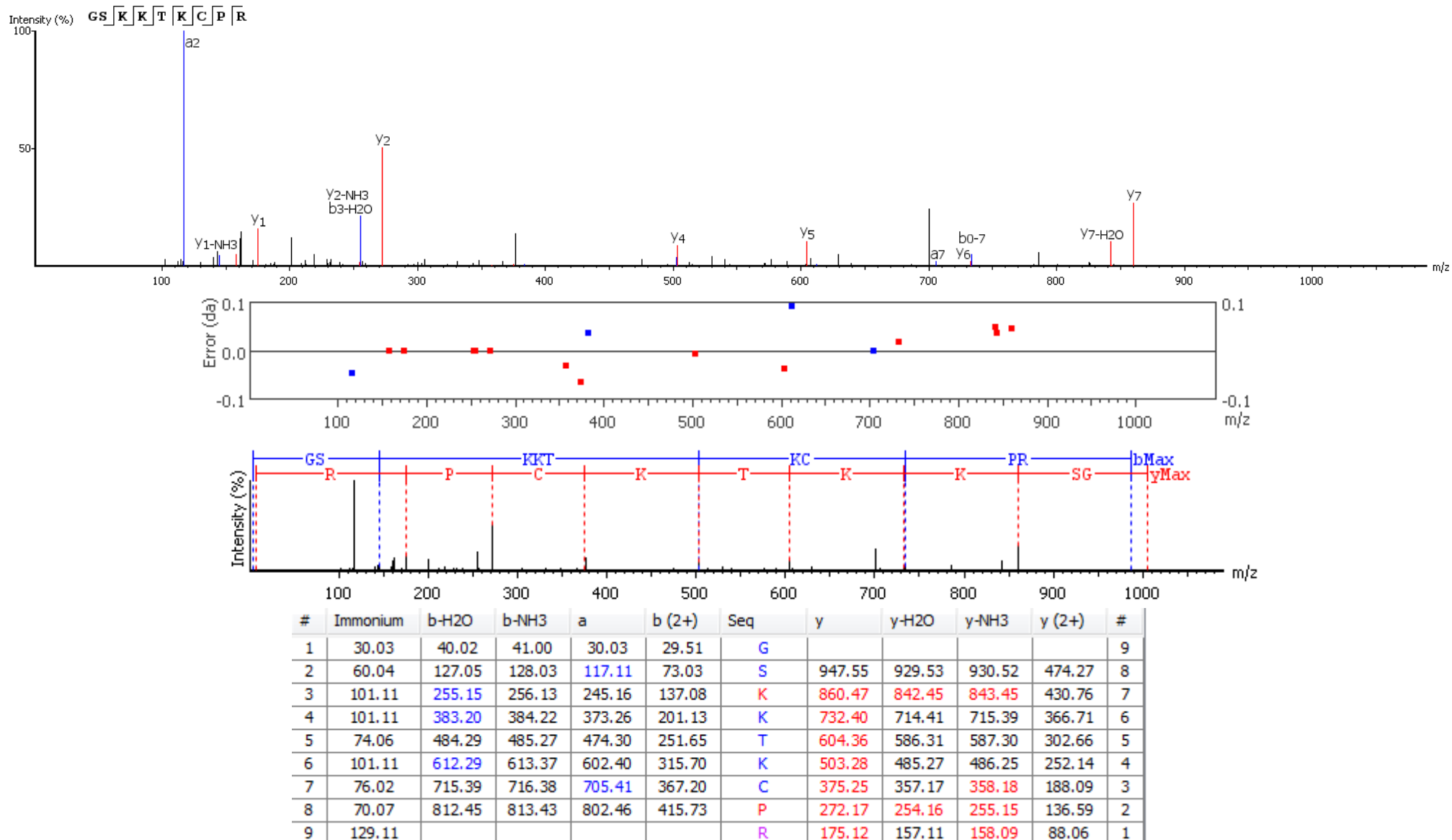


FIGURA 56. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 502,7856 m/z. PM experimental: 1003,559 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

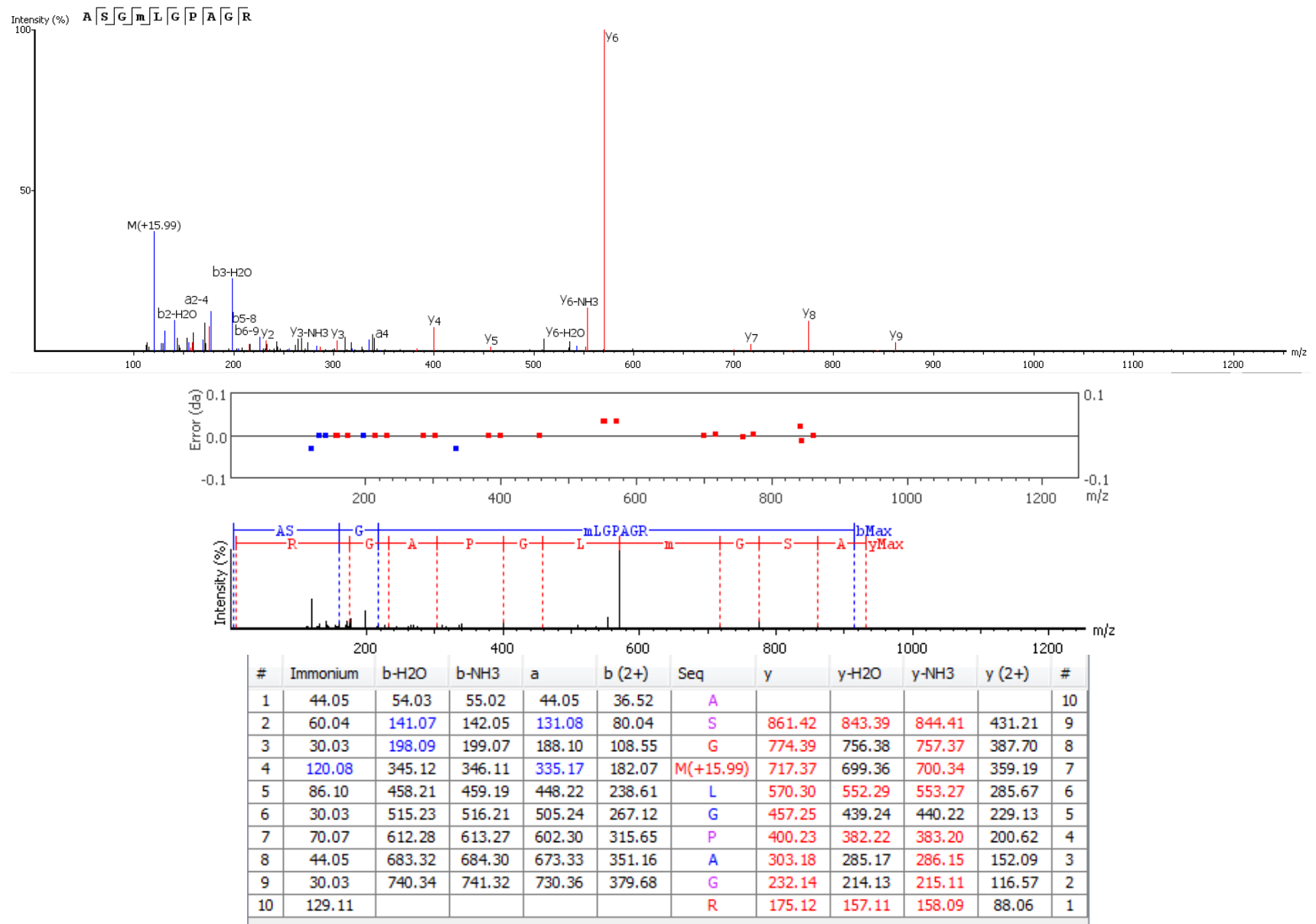


FIGURA 57. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 466,7323 m/z. PM experimental: 931,454 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

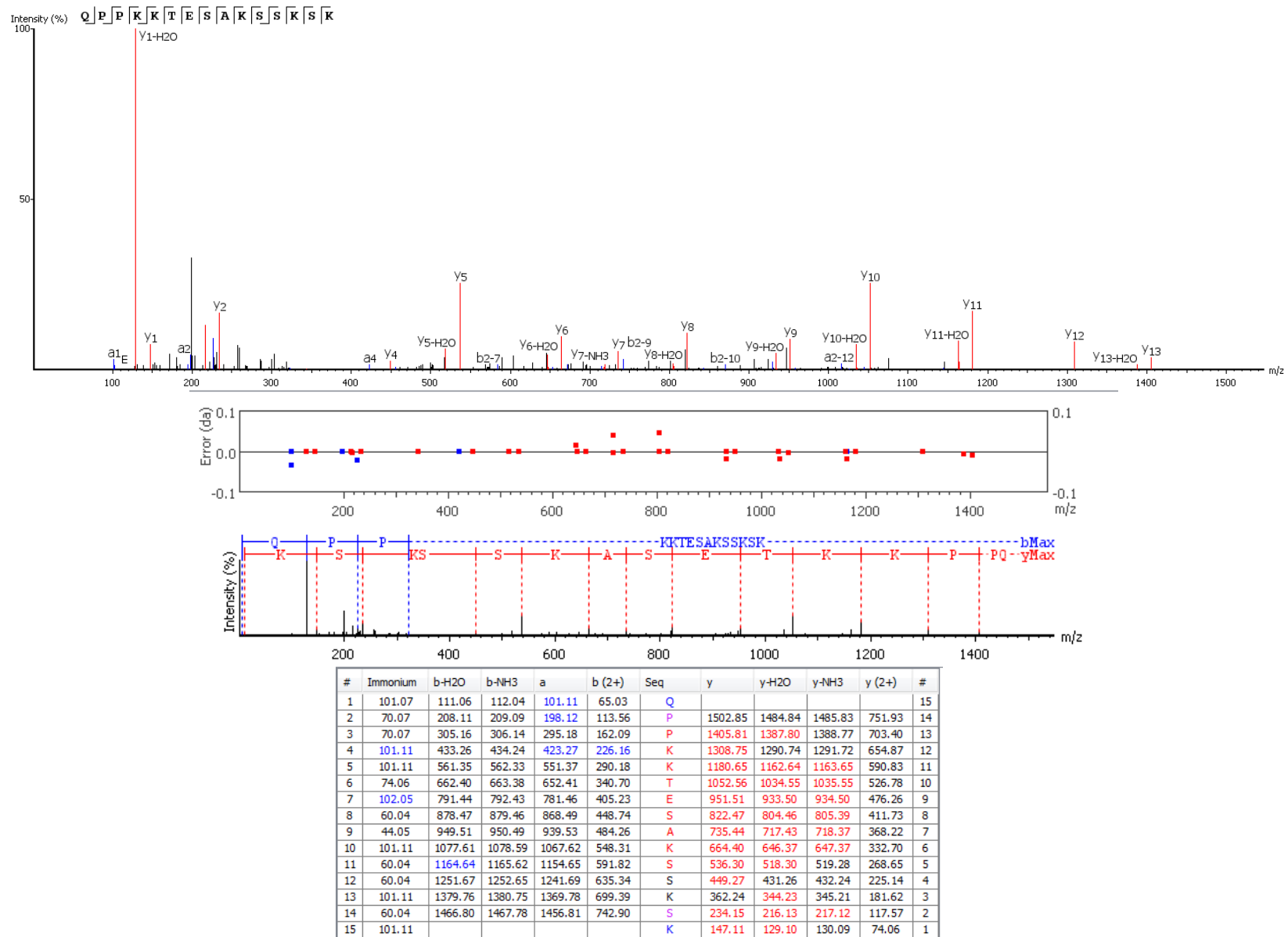


FIGURA 58. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 408,4852 m/z. PM experimental: 1629,905 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).



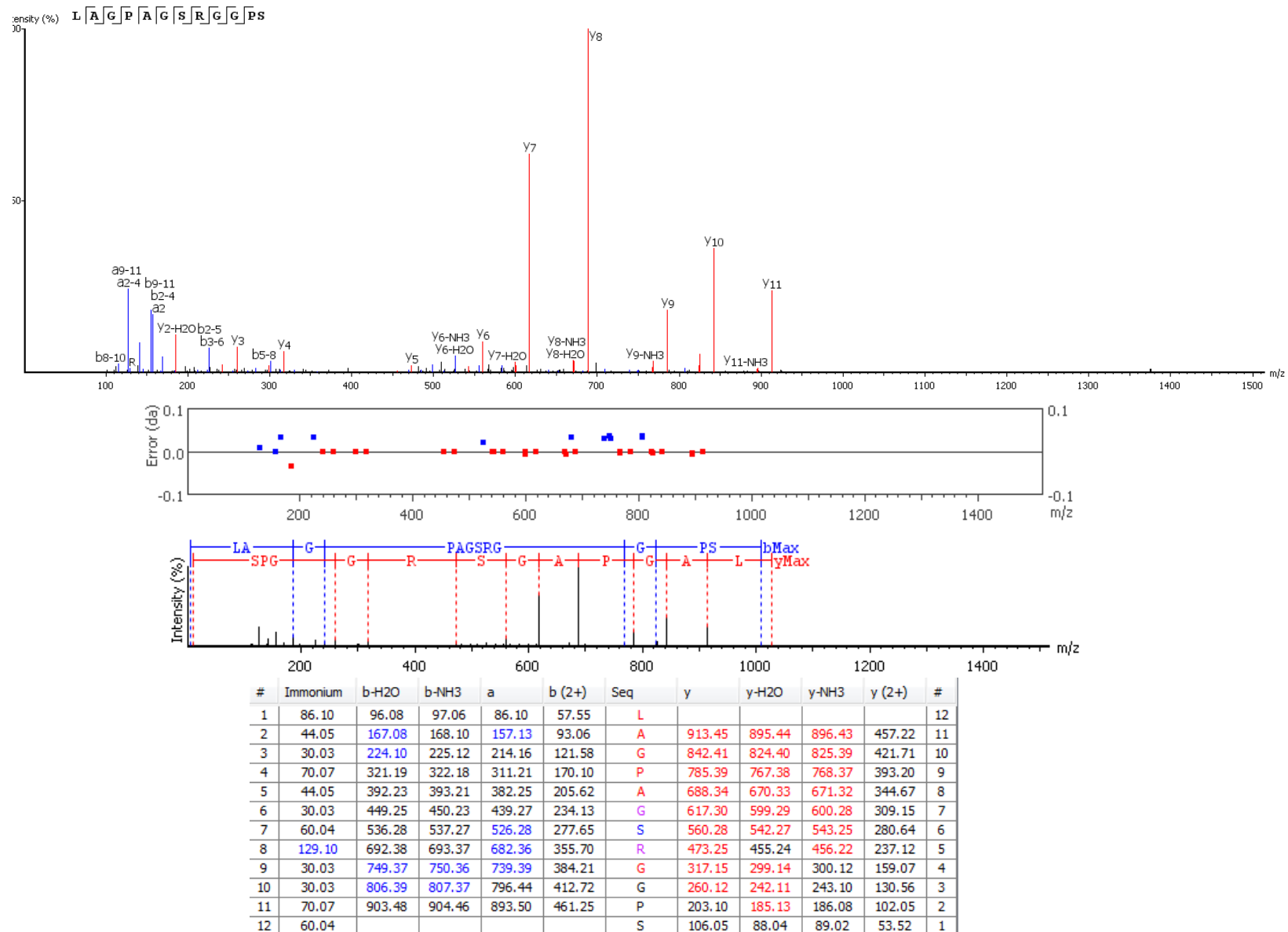


FIGURA 59. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 513,7693 m/z. PM experimental: 1025,525 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

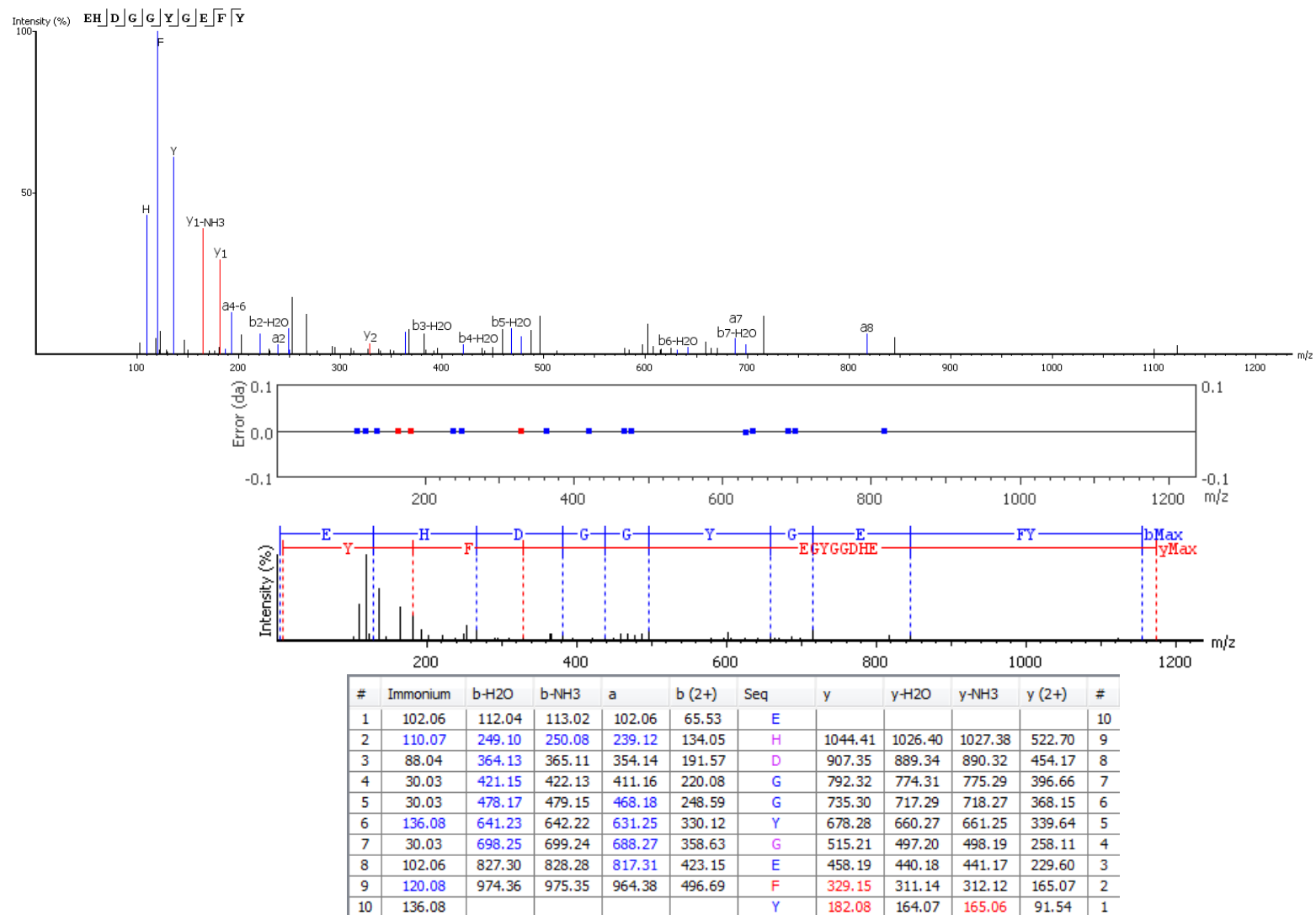


FIGURA 60. Análisis peptidómico del espectro MS-MS del ion con carga +2, 587,2277 m/z. PM experimental: 1172,440 (corresponde a la secuencia con el extremo C-terminal amida).

## II.4. Análisis fisicoquímico de las secuencias seleccionadas

En primera instancia, el peso molecular teórico de las secuencias fue calculado a través de la utilización del servidor Pepcalc – Innovagen (<https://pepcalc.com>). Posteriormente fueron comparados con los pesos moleculares experimentales obtenidos, y en todos los casos se corroboró que los péptidos eran de tipo carboxiamida (ver Tabla 8). El hecho de que los péptidos sean de tipo carboxiamida es común y característico en la gran mayoría de los péptidos aislados a partir de fuentes naturales [23]. Dentro de los péptidos aislados a partir de las secreciones de ranas, los PAMs son los más reportados. La familia de PAMs *Alyteserina-1* (*1a*, *1b*, *1c*, y *1d*), así como también la *Alyteserina-2* (*2a*, *2b*, y *2c*), aislados del bufo *Alytes obstetricans* son de tipo carboxiamida [245]. Otros péptidos como el *PGLa* obtenido a partir del bufo *X. laevis* y la *Maximina-H* de la *B. máxima*, ambos potentes antimicrobianos demostraron ser de tipo carboxiamida [245]. Las *Ocelletinas* (1 a 4) aisladas de *L. latrans* también presentan este tipo de característica molecular [22]. Los péptidos *Hp-1971*, como *Hp-1935* aislados de la especie *B. pulchella*, los cuales actúan tanto como antimicrobianos, y como inhibidores de las colinesterasas, han demostrado ser de terminación carboxiamida [29].

La Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos (en inglés, *Antimicrobial Peptide Data Base* o APDB) (<http://aps.unmc.edu/AP/>), es una base de datos que recompila más de 3200 secuencias de péptidos con sus diferentes actividades biológicas reportadas (Tabla 9). Si bien la mayoría de los péptidos reportados corresponden a PAMs, la información brindada por la APDB no se limita solo a esta, sino que también informa sobre actividades antitumorales, antioxidantes, antivirales, entre otras. Esta representa una herramienta útil para los estudios comparativos entre secuencias novedosas frente a otras ya reportadas.

Los péptidos aquí identificados mostraron poseer una longitud de secuencia relativamente corta, de entre 8 y 15 residuos de aminoácidos, con longitudes promedio de 11,13; 12,3 y 10 residuos para las series BcI, BcII y PmII, respectivamente (ver Tabla 8). La información que recompila la base de datos de la APDB muestra que la mayoría de los péptidos bioactivos reportados son de una longitud promedio de 33,26 aminoácidos. Sin embargo, varios péptidos de entre 10 y 15 aminoácidos aislados de ranas han demostrado ser bioactivos. Las *Temporinas* (*Temporinas-A*, *Temporinas-B*, *Temporinas-*

*C*, *Temporinas-E*, *Temporinas-F*, *Temporinas-G*, y *Temporinas-L*), son una superfamilia de péptidos ricos en leucina, aislados de las secreciones de la *Rana temporaria*, con una longitud de 13 aminoácidos. Estos péptidos son de un amplio rango de actividades biológicas entre los que se destacan sus actividades como agentes antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiparasitarios, quimiotácticos, anticancerígenos, entre otras [31]. Además, la *Hylaseptina-P1* (GILDAIKAIKAAG) aislado de la rana sudamericana *Hyla punctata* (Anura: Hylidae) con actividad antimicrobiana y antifúngica posee 14 aminoácidos [246]. Otro de los péptidos de un amplio espectro de actividad biológica que se encuentra constituido por 10 aminoácidos es el conocido *PGLa-H* (KIAKVALKAL) [25].

**TABLA 9.** Péptidos bioactivos reportados en la *Antimicrobial Peptide Data Base* (APDB).

Bioactividades	Número de péptidos reportados	Porcentaje del total
Antimicrobianos	2719	83,71 %
Antivirales	190	5,84 %
Antifúngicos	1209	37,22 %
Anti- <i>Candida</i>	673	20,72 %
Anti-biofilm	65	2,4 %
Antiparasitarios	138	4,24 %
Insecticidas	39	1,2 %
Espermicidas	14	0,43 %
Anti-HIV	109	3,35 %
Antitumorales	251	7,72 %
Quimiotácticos	62	1,9 %
<i>Wound Healing</i>	23	0,7 %
Antioxidantes	26	0,8 %
Inhibidores enzimáticos	31	0,95 %
Inmovilizadores	31	0,95 %
Anti-MRSA	180	5,54 %
Antitoxinas	15	0,46 %
Anticanales	7	0,21 %
Antiinflamatorios	24	0,73 %
Antidiabéticos	16	0,49 %
Antituberculosis	14	0,43 %
Antiendotóxicos	85	2,61 %
Doble cadenas	35	1,07 %
Sinérgicos	47	1,44 %
<b>Total</b>	<b>3248</b>	<b>100 %</b>

En lo que respecta a la carga de los péptidos identificados, estos son mayoritariamente catiónicos, con una carga neta de entre +1 y +5. Sin embargo, cinco

péptidos de la serie BcI (BcI-2, BcI-3, BcI-5, BcI-7, y BcI-9) mostraron estar cargados negativamente, con carga neta -1, como también el de PmII (PmII-1) con carga -2 (ver Tabla 8). Los datos recopilados por la APDB informan que la carga promedio de péptidos bioactivos reportados es de +3,3 [244]. La cationicidad de los péptidos es un hecho que se ha vinculado intrínsecamente a la bioactividad de los mismos, principalmente debido a su capacidad de interactuar con membranas biológicas cargadas negativamente [29]. Revisiones bibliográficas actuales reportan hasta la fecha más de 600 péptidos aislados de especies de ranas y sapos, la mayoría de estos catiónicos [17; 26]. Entre ellos, se pueden mencionar a las superfamilias de las *Dermaseptinas*, las *Temporinas*, las *Tigerininas*, entre otros [17; 26]. Por otro lado, la información respecto a péptidos aniónicos aislados de las pieles de anfibios es sumamente escasa. Al respecto, solo dos péptidos aniónicos fueron identificados la *Maximina-H5* (ILGPVLGLVSDTLDD VLGIL) (carga neta = -2), aislado de *B. maxima* que mostró actividad antimicrobiana solo contra una cepa de *S. aureus* [247] y el péptido *Ll-1577* (carga neta = -2), con considerable actividad frente a *E. coli* y *S. aureus* [23]. Los escasos reportes de péptidos aniónicos, hace que el estudio de las secuencias aquí identificadas con estas características sea sumamente prometedor.

Otra de las evaluaciones llevadas a cabo sobre la base de las secuencias obtenidas, fue el análisis de su composición aminoacídica. Para ello, a cada una de las series (BcI, BcII y PmII) se les calculó el *ratio* de aminoácidos y se los comparó con lo reportado en la base de datos (Tabla 10). Se pudo observar que las series estudiadas presentan una composición de aminoácidos en concordancia con lo reportado para péptidos con actividades biológicas [244]. Los resultados muestran que los péptidos están conformados principalmente por residuos de Ala y Gly. En las secuencias de las series BcI y BcII se observó un alto contenido de residuos claves en la bioactividad, como son Lys, Leu, Ser, Pro y Arg. Se ha demostrado que los péptidos ricos en Lys y Arg poseen notables actividades biológicas actuando principalmente como agentes antimicrobianos y antifúngicos [26]. Esto es debido a que estos residuos cargados positivamente aportan cationicidad a la secuencia, permitiendo interactuar con membranas cargadas de forma negativa [26; 248]. Además, la presencia de residuos como la Ser y Pro, han demostrado ser claves en la actividad antimicrobiana y/o antioxidante de péptidos [40].

**TABLA 10.** Información fisicoquímica y estructural de las secuencias identificadas.

Péptidos	Hidrofobicidad por AA <sup>(a)</sup>	Gravy (H) <sup>(b)</sup>	%Hid/Total AA <sup>(c)</sup>	% Ratio AA <sup>(d)</sup>					PI	Estructura Secundaria		Condiciones Intestinales	
				AA	BcI	BcII	PmII	BD		PEP-FOLD <sup>(e)</sup>	% Hélice	Vida media (s)	Estabilidad
<b>BcI-1</b>	<b>G S K A F A A L L E S R</b>	0,158	50	I	0	0	0	5,9	11,41	Hélice (S <sub>2</sub> -S <sub>11</sub> )	83,3	1,676	Alta
<b>BcI-2</b>	<b>D P K L E E E R</b>	-2,525	12,5	V	5,98	0	0	5,69	4,57	Hélice (P <sub>2</sub> -E <sub>7</sub> )	75	2,397	Alta
<b>BcI-3</b>	<b>T P G H G A E Y G A E A L E R</b>	-0,920	33,3	L	7,78	5,4	0	8,25	5,36	Hélice (A <sub>6</sub> -R <sub>15</sub> )	66,67	2,104	Alta
<b>BcI-4</b>	<b>R M A C C C A P R</b>	0,2667	66,6	F	2,99	0	10	4,09	8,9	Hélice (M <sub>2</sub> -A <sub>7</sub> )	55,56	1,239	Alta
<b>BcI-5</b>	<b>D D D H S V V Y T R</b>	-1,260	30	C	2,39	0	0	6,81	5,13	Coil	0	0,595	Normal
<b>BcI-6</b>	<b>S G K A F A K E V R</b>	-0,640	40	M	1,19	2,7	0	1,26	11,57	Hélice (F <sub>5</sub> -V <sub>9</sub> )	50	1,086	Alta
<b>BcI-7</b>	<b>E A D A A A G E P L P R</b>	-0,633	41,6	A	16,16	13,51	10	7,66	4,32	Hélice (A <sub>2</sub> -A <sub>6</sub> )	41,67	1,858	Alta
<b>BcI-8</b>	<b>T M E V V D S A G T S T R</b>	-0,269	30,7	W	0	0	0	1,65	6,62	Hélice (M <sub>2</sub> -S <sub>7</sub> )	53,85	3,001	Alta
<b>BcI-9</b>	<b>D E D G H L L R</b>	-1,375	25	G	9,58	18,91	30	11,5	5,23	Coil	75	1,712	Alta
<b>BcI-10</b>	<b>P S L G A E E N Q V L T P R</b>	-0,714	28,6	P	8,38	13,51	0	4,67	7,46	Hélice (A <sub>5</sub> -V <sub>10</sub> )	42,86	1,831	Alta
<b>BcI-11</b>	<b>G S R V F S V R</b>	0,025	37,5	T	4,19	2,7	0	4,48	14	Coil	0	0,073	Baja
<b>BcI-12</b>	<b>P D G A P P P P V H A L K A A</b>	-0,253	40	S	7,18	18,91	0	6,07	10,57	Hélice (A <sub>11</sub> -A <sub>15</sub> )	33,33	1,109	Alta
<b>BcI-13</b>	<b>G S A F A A K L V S P R</b>	0,350	50	Y	1,19	0	20	2,49	14	Hélice (S <sub>2</sub> -S <sub>10</sub> )	75	2,015	Alta
<b>BcI-14</b>	<b>S G A A F A L L K A S R</b>	0,600	58,3	Q	0,59	2,7	0	2,59	14	Hélice (G <sub>2</sub> -S <sub>11</sub> )	83,33	1,442	Alta
<b>BcI-15</b>	<b>G S K K T K C P R</b>	-1,911	11,1	N	0,59	0	0	3,86	11,68	Coil	0	1,797	Alta
<b>BcII-1</b>	<b>A S G M L G P A G R</b>	0,120	40	E	8,38	2,7	20	2,69	14	Coil	0	1,095	Alta
<b>BcII-2</b>	<b>Q P P K K T E S A K S S K S K</b>	-2,120	6,6	D	5,38	0	0	2,7	11,28	Hélice (P <sub>3</sub> -S <sub>14</sub> )	73,34	2,187	Alta
<b>BcII-3</b>	<b>L A G P A G S R G G P S</b>	-0,292	25	H	2,39	0	10	2,17	14	Coil	0	1,538	Alta
<b>PmII-1</b>	<b>E H D G G Y G E F Y</b>	-1,470	20	K	5,98	13,51	0	9,51	4,31	Coil	0	1,247	Alta
				R	9,58	5,40	0	5,88					

<sup>(a)</sup> Residuos hidrofóbicos son mostrados en color Rojo. <sup>(b)</sup> %hid/TotalAA: porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos sobre el total de aminoácidos de las secuencias. <sup>(c)</sup> Gravy (H): Valor de hidrofobicidad de acuerdo con la escala de Eisenberg. <sup>(d)</sup> % Ratio de AA: el *ratio* fue definido como el porcentaje de cada uno de los veinte aminoácidos presentes en cada una de las series. (BD): porcentaje de aminoácidos que forman parte de secuencias peptídicas bioactivas según la base de datos de la APDB (<http://aps.unmc.edu/AP/>) [244]. <sup>(e)</sup> Estructura secundaria determinada mediante PEP-FOLD 3.5 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>)

En cuanto a la hidrofobicidad de los péptidos, esta fue analizada a través del porcentaje de residuos hidrofóbicos presentes en cada secuencia y mediante el índice Gravy (H) (ver Tabla 10). El análisis *in silico* de los péptidos aquí estudiados mostró que estos son principalmente de una hidrofobicidad media-baja, presentando porcentajes de residuos hidrofóbicos de entre el 6 y 66 %; y valores tanto negativos como positivos de H (ver Tabla 10). Para la serie BcI, los péptidos de mayor hidrofobicidad fueron BcI-4, BcI-13 y BcI-14, con índice H de 0,2667; 0,350 y 0,600, respectivamente. Mientras que los de menor hidrofobicidad resultaron ser BcI-2, BcI-5, BcI-9 y BcI-15. En lo que respecta a la serie BcII, solamente BcII-1 mostró poseer una hidrofobicidad media con un valor de H de 0,120 y un 40 % de residuos hidrofóbicos. Por último, el péptido PmII-1 resultó de baja hidrofobicidad conteniendo solo dos residuos hidrofóbicos.

La hidrofobicidad, junto a la cationicidad anteriormente mencionada, son características fundamentales para la bioactividad, en particular de los PAMs. Esto es debido a que los péptidos, en adición a la carga positiva que les permite la interacción con las membranas biológicas negativamente cargadas, la hidrofobicidad les permite atravesar las membranas mediante diferentes mecanismos, haciendo a su actividad antimicrobiana [29]. Revisiones llevadas a cabo sobre los PAMs demuestran que estos están constituidos al menos por el 50 % de aminoácidos hidrofóbicos [26]. Sin embargo, una hidrofobicidad elevada hace que el péptido pierda selectividad y presente altos niveles de hemólisis. Respecto a esto, se pueden mencionar a los PAMs *Temporina-SHa* [249], *Temporina-1Bya* [250], *Temporina-LTa* [250], *Temporina-D* [31], *Temporina-L* [31], la *Brevinina-1DYa*, *1DYb*, *1DYc* y *1CSa* [251], *Brevinina-1E* y *1Ea* [252], la *Dermaseptina-S4* [27], entre otros, que contienen entre un 60 y 75 % de residuos hidrofóbicos y poseen alta actividad lítica frente a glóbulos rojos.

Péptidos con otras actividades biológicas demostraron poseer cierto grado de hidrofobicidad. Como es el caso de los potentes antioxidantes *Antioxidina-1* (TWYFITPYIPDK-NH<sub>2</sub>) y *Antioxidina-RP1* (AMRLTYNKPCLYGT-NH<sub>2</sub>) asilados de la rana *Physalaemus nattereri*. Estos poseen un 50 % de residuos hidrofóbicos y un valor de H de 0,813 y 0,503 para *Antioxidina-1* y *Antioxidina-RP1*, respectivamente [60].

En cuanto a péptidos con la capacidad de actuar como inhibidores enzimáticos, la *Kunitzina-RE* (AAKIILNPKFRCKAAFC-NH<sub>2</sub>) asilado de la piel de la rana *Rana*

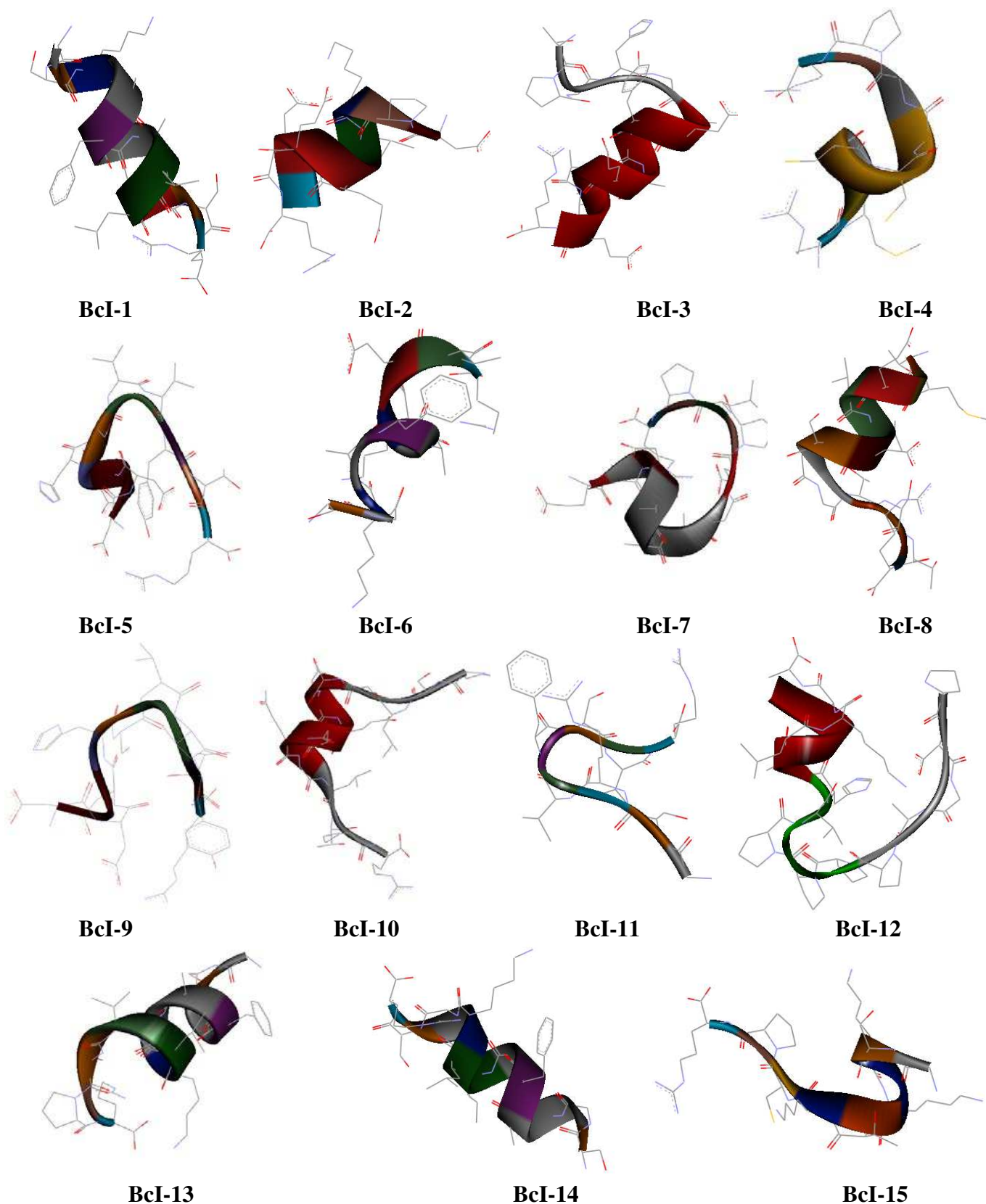
*esculenta*, presenta actividad inhibidora de la proteasa tripsina y una hidrofobicidad moderada con valor H de 0,549 y 58 % de residuos hidrofóbicos [253]. Por otro lado, los péptidos *Hp-1971* (TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR-NH<sub>2</sub>) y *Hp-1935* (KLSPSLGPVS KGKLLAGQR-NH<sub>2</sub>) con capacidad de inhibir a las colinesterasas, poseen baja hidrofobicidad, conteniendo un 35 y 31,1 % de aminoácidos hidrofóbicos y valores H de -0,071 y -0,279, respectivamente [29].

## II.5. Análisis estructural de los péptidos

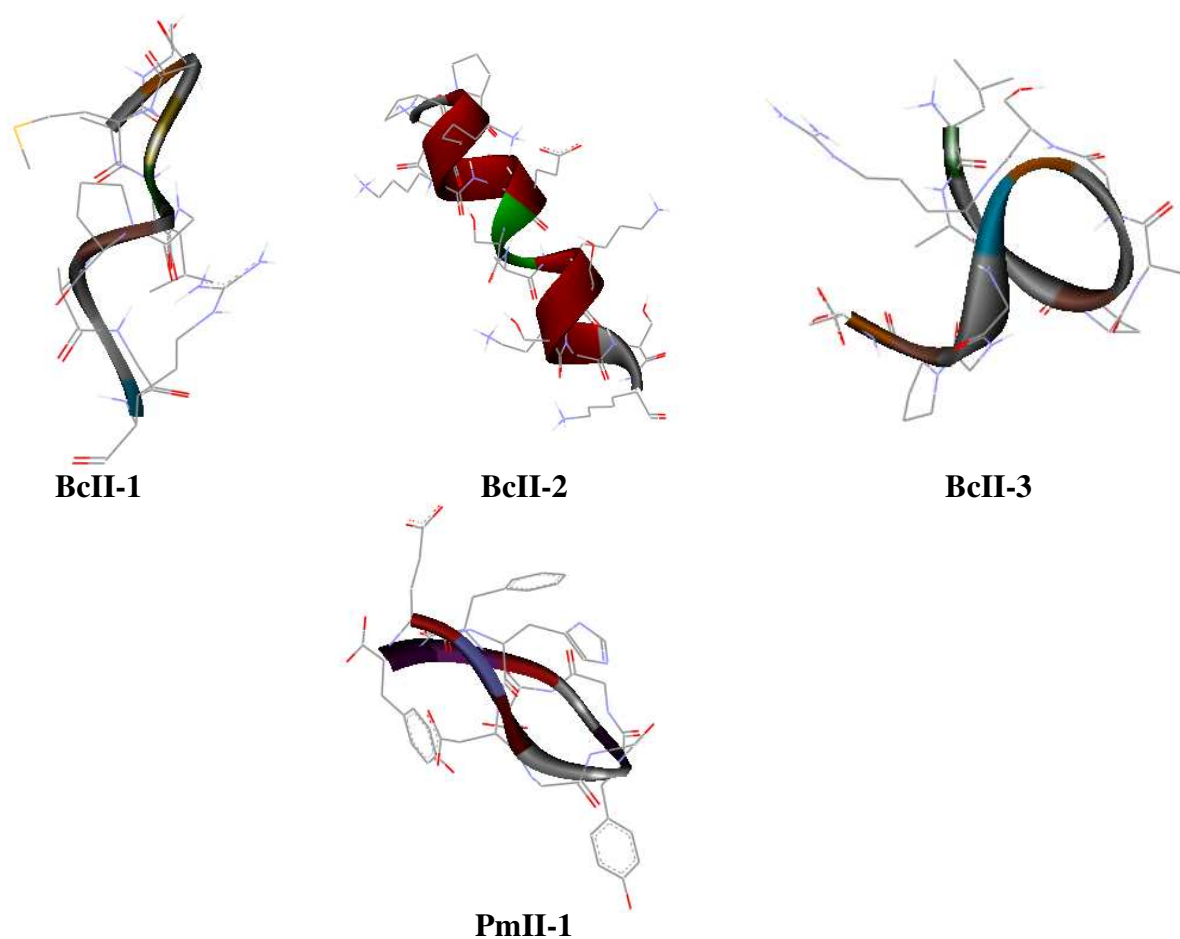
Los resultados de las estructuras secundarias predichas por el PEP-FOLD 3.5 se muestran en la Figura 61. Mientras que los porcentajes hélices  $\alpha$  por secuencia y las regiones de aminoacídicas que forman parte de estas, son informados en la Tabla 10. Las predicciones computacionales mostraron que mayoritariamente los péptidos presentan estructuras de hélices  $\alpha$  acompañados de zonas desestructuradas o *Coil*. Ninguna de las secuencias presentó conformación  $\beta$  o lamina plegada. Por otro lado, se pudo observar para la mayoría de los casos, que las zonas de hélices  $\alpha$  en las secuencias correspondieron a regiones comprendidas por aminoácidos hidrofóbicos. La excepción a esto, fueron los péptidos BcI-2 y BcII-2, en los cuales su predicción presentó un 75 y 73 % de hélice  $\alpha$  en su estructura, respectivamente, poseyendo ambos un solo residuo hidrofóbico.

La estructura de los péptidos representa un eje fundamental en su funcionalidad biológica. En lo que respecta a la actividad antimicrobiana, si bien no es un acuerdo universal, muchos estudios han demostrado que las interacciones péptido-lípido conducen a la permeabilización de las membranas biológicas. Se ha propuesto que los péptidos  $\alpha$ -helicoidales anfipáticos actúan a través de tres mecanismos generales: formación de poros transmembrana mediante un mecanismo de "duela de barril", la solubilización de la membrana mediante un mecanismo de "carpetas", o la formación de "agujeros de gusanos" [29]. Como ejemplo, las *Temporinas*, son una superfamilia de PAMs de amplio espectro, propensas a formar una hélice  $\alpha$  anfipática estable en un entorno mimético de membrana. Se propuso que la falta de selectividad de estos péptidos está relacionada principalmente a la unión a la membrana a través de interacciones hidrófobas, ya que presentan bajo número de cargas positivas [254]. También se ha reportado que las *Ceratotoxinas*, péptidos catiónicos y  $\alpha$ -helicoidales aislados de *Ceratitis capitata* (mosca de la fruta) [255], y el péptido *Ctx-Ha*, aislado de la rana *Hypsiboas albopunctatus*, también actúan por este mecanismo [256].





**FIGURA 61.** Estructuras secundarias de los péptidos identificados de las tres series, predichos por el servidor mediante PEP-FOLD 3.5 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>) y visualizada mediante el software Discovery Studio Visualizer 2017.



**FIGURA 61 (cont.).** Estructuras secundarias de los péptidos identificados de las tres series, predichos por el servidor mediante PEP-FOLD 3.5 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>) y visualizada mediante el software Discovery Studio Visualizer 2017.

Por otro lado, la actividad de los péptidos como inhibidores enzimáticos depende de la estructura que estos poseen. Esto es debido a que necesitan tener determinada conformación para ingresar a sitios específicos de la enzima y lograr así la inhibición. Por lo cual la estructura será particular para cada caso. Por ejemplo, el péptido *Kunitzina-RE*, inhibidor de la enzima tripsina, ha mostrado ser desestructurado; al igual que el inhibidor de las colinesterasas *Hp-1971* [61; 253]. Mientras que *Hp-1935* posee una región central helicoidal flanqueada por zonas desestructuradas, lográndose la inhibición de la AChE por la interacción de residuos ubicados en ambas zonas estructurales [43].

A modo de resumen, mediante la caracterización fisicoquímica y estructural de las secuencias identificadas, se pudo observar que los péptidos son de una longitud de cadena relativamente corta, cargados tanto positiva como negativamente, y que poseen una hidrofobicidad de media a baja, hecho que se ve reflejado en la formación de

estructura secundaria. Los datos adquiridos mediante los estudios *in silico* poseen gran utilidad, ya que brindan valiosa información a la hora de analizar el mecanismo de acción biológica de los péptidos.

## II.6. Análisis proteolítico de los péptidos

A través de la utilización del servidor HLP (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/>) se realizó un estudio *in silico* de la estabilidad proteolítica de los péptidos a través de la evaluación de su vida media en un ambiente intestinal. Este servidor, toma como modelos resultados experimentales de la hidrólisis de péptidos frente a proteasas intestinales, para comparar y predecir la estabilidad de otros péptidos [243]. Los resultados se clasifican en Baja, Normal o Alta estabilidad y dependen del tiempo de vida media; es decir aquellos péptidos que tengan un tiempo de vida media menor a 0,1 segundos se consideran con una estabilidad Baja; si este parámetro se encuentra entre 0,1 y 1,0 significa que la estabilidad es Normal; y si el tiempo de vida media es mayor a 1,0 la estabilidad es Alta.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de tiempo de vida media, expresados en segundos, y el tipo de estabilidad para los péptidos estudiados. Los resultados muestran que la estabilidad de los péptidos es alta con tiempos de vida media que alcanzan los 3 s. Solamente, los péptidos BcI-5 y BcI-11 mostraron una estabilidad normal y baja, respectivamente.

Una de las desventajas del uso de péptidos naturales como fármacos es su inestabilidad fisicoquímica, así como su tendencia a la agregación, hechos que condicionan su vida media en el organismo, traduciéndose en una escasa disponibilidad. Es por esto que, en función de mejorar la vida media de péptidos, para el desarrollo de nuevas drogas peptídicas, diversas investigaciones en el área de la química sintética y diseño racional tienen como labor central la búsqueda de modificaciones en las secuencias de los péptidos bioactivos que mejoren sus propiedades, ya sea para potenciar su actividad biológica o su farmacocinética [257].

Los péptidos aislados de las pieles de *B. cordobae* y *P. minuta* aquí estudiados mostraron ser de una alta estabilidad mayoritariamente. Si bien estos resultados fueron obtenidos de modo *in silico* representan un buen punto de partida para estudios en profundidad.

## II.7. Análisis comparativo con secuencias reportadas

A fin de identificar la novedad de las secuencias identificadas, se realizó un análisis a través de alineamientos de estas frente a secuencias reportadas en base de datos específicas de péptidos de la APDB (<http://aps.unmc.edu/AP/>).

La Tabla 11 muestra información referida al alineamiento de las secuencias, así como también datos sobre la actividad biológica de los péptidos similares. Las diecinueve secuencias estudiadas mostraron ser novedosas, con una baja similitud frente a secuencias reportadas, no superando el 45 % en ninguno de los casos. Es interesante destacar que, en la mayoría de los casos, los alineamientos se dieron con péptidos reportados de especies de anfibios, principalmente ranas y sapos. Esto podría sugerir que los péptidos aislados a partir de pieles de anfibios poseen cierta conservación en sus secuencias. Paralelamente, se pudo observar que en su mayoría las secuencias presentaron cierto grado de similitud con péptidos con capacidad antimicrobiana. No hallándose para ninguno de los casos similitudes con péptidos con capacidad inhibitoria de enzimas o antioxidantes.

A continuación, se brinda información detallada acerca de las actividades biológicas que han presentado los péptidos reportados más similares a los aquí estudiados:

De la serie BcI, el péptido BcI-1 mostro poseer una similitud del 41 % con los péptidos *Brevinina-ITSa* [258] y la *Hylaina-1* [259], ambos aislados de especies de ranas asiáticas. Estos péptidos son poseedores de una actividad antimicrobiana de amplio espectro, tanto para bacterias Gram (-) como Gram (+), así también como han resultado activos frente a *C. albicans*. La *Brevinina-ITSa* por su parte mostró ser hemolítico.

BcI-2 presentó un máximo de similitud del 40 % con el péptido aislado de la planta de coco *Cocos nucifera*. Este péptido de diez residuos posee una carga neta negativa de -4, cabe mencionar que BcI-2 también es aniónico (-1). El péptido aislado de *Cocos nucifera* ha demostrado bioactividad como agente antifúngico inhibiendo el desarrollo del hongo *Mycosphaerella arachidis*, y antiviral contra el HIV [260].

La secuencia de BcI-3 manifestó una similitud del 38 % con la *Plantaricina DL3*. Las *Plantaricinas* son bacteriocinas aisladas de la bacteria *Lactobacillus plantarum*. Este péptido ha resultado activo contra las bacterias Gram (+), *Listeria monocytogenes*, *S.*

*aureus* y *Bacillus cereus*; y las Gram (-) *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*; *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Psychrobacter* sp., *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, y *Pseudomonas aeruginosa* [261].

BcI-4 por su parte, presentó el 40 % de similitud con el fragmento 1-13 de la *alfa defensina humana* (HD-5). Esta proteína forma parte del sistema de defensa humano con diversas actividades biológicas. El fragmento HD-5 (1-13) ha sido altamente activo frente a las cepas de *B. subtilis*, *B. breve*, *B. lonqum*, *B. adolescentis*, *B. vulqatus*, *E. coli*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, y *Streptococcus solivarius salivarius* [262].

En cuanto a BcI-5, se observó un 31 % de similitud con el péptido cíclico *A21978C1* aislado de *Streptomyces roseosporus*, el cual ha resultado activo frente a diversas cepas de estreptococos y estafilococos, incluidos *S. aureus* meticilino resistentes y neumococos penicilinos resistentes. comparándose su potencia con la vancomicina [263]. El *A21978C1* posee una carga neta de -3 resultando ser aniónico al igual que BcI-5. Por otro lado, BcI-5 fue similar en un 30 % a la *Lacraína* aislada del ciempiés brasileiro *Scolopendra viridicornis*, que ha sido activa contra bacterias Gram (-) [264].

BcI-6 resultó similar a dos péptidos, la *Oncorincina I* y la *Hylaina-2*, en un 43 y 40 %, respectivamente. El primero, fue obtenido a partir de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, y ha presentado actividad frente a bacterias Gram (+) [265]. Mientras que la *Hylaina-2* perteneciente a secreciones de la rana *Hyla simplex*, resultó activa tanto para bacterias Gram (+) como Gram (-), además de mostrar capacidad antifúngica frente a *C. albicans* [259].

Por su parte, la similitud de BcI-7 fue de un 33,3 % frente a tres péptidos. *Vk7* aislado de la saliva del dragón de Komodo, péptido altamente cargado con carga neta +7, y activo contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* [266]. En segundo lugar, la *Mastopatanina-VT2* obtenida de las glándulas venenosas de la avispa *Vespa tropica*, la cual ha inhibido el crecimiento de bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), además de actuar como antifúngico frente a diversas cepas de *C. albicans*, y *C. parapsilosis* [267]. Y por último, BcI-7 mostró similitud con el péptido cargado negativamente (-1) *Alameticina*, aislado del hongo *Trichoderma viride*, con capacidad anti bacterias Gram (+), antifúngico y antiparasitario [268].

BcI-8 fue 33,3 % similar en secuencia con el péptido antimicrobiano *Temporina-Rb*, aislado de las secreciones de la *Rana ridibunda*. Este ha mostrado actividad frente a cepas de *E. coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, y *Klebsiella pneumoniae*. Además, este péptido presentó baja capacidad hemolítica [269].

En cuanto a BcI-9, dos péptidos obtenidos a partir de secreciones de ranas y sapos mostraron una similitud de alrededor del 40% con este. El más similar a BcI-9 fue el péptido *XLA<sub>sp</sub>-P2* del sapo africano *X. laevis*. Este hexapéptido con carga neta -5, demostró ser activo frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) [270]. Por otro lado, presentó similitud con el péptido *Ll-1577*, también cargado negativamente (-2) y activo contra bacterias Gram (+) y Gram (-) [23].

Dos péptidos con 37 y 35 % de similitud a BcI-10 fueron encontrados. El primero el *Péptido-2* obtenido a partir de la secreción de la *R. temporaria*, el cual ha resultado activo frente a la bacteria Gram (+) *S. aureus* [271]. Y el segundo, la *Carnocina UI49*, es una bacteriocina aislada de la bacteria *Carnobacterium* sp. que habita en peces. La *Carnocina UI49* ha presentado la capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias tanto Gram (+) como Gram (-) [272].

Para BcI-11 la máxima similitud se presentó con las secuencias de la *Andricina B* (45,78 %) y *Cn-AMP2* (44,45 %). El primer péptido se aisló de la sangre de la salamandra gigante china *Andrias davidianus*, y ha presentado capacidad inhibitoria del crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-), así como también potencial antifúngico [273]. En lo que respecta a *Cn-AMP2*, aislado de la especie de coco *C. nucife*, además de actividad antibacteriana frente a Gram (+) y Gram (-) [274], notablemente ha demostrado capacidad anticancerígena evitando la proliferación de células de glioblastoma humano [275].

Para BcI-12 se obtuvo una similitud de secuencia frente a dos péptidos aislados de especies de sapos. El péptido *Pxt-2* de *Xenopus tropicalis* con un 43,75 % de similitud [276], y el péptido *PGLa-H* de *X. laevis* con un 40 % [277]; ambos activos contra bacterias Gram (+) y Gram (-).

Tres péptidos aislados de anfibios presentaron similitud con BcI-13. Con el 45 y 41 % los péptidos *CPF-L2* y *CPF-L1* aislados del sapo *X. lenduensis* [278]; y con el 40

% de similitud *Ll-2085* obtenido a partir de las secreciones de *L. latrans* [23]. Los tres péptidos han demostrado actividad antibacteriana contra Gram (+) y Gram (-).

En cuanto a BcI-14, un 42 % de similitud de secuencia fue encontrada con la *Meucina-13* aislada del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus*. Las *Meucinas* representan una familia de péptidos de un amplio espectro de actividades biológicas. La *Meucina-13* ha demostrado actividad contra las bacterias Gram (+), *Bacillus* sp., *Micrococcus luteus*, *B. megaterium*; las bacterias Gram (-), *Agrobacterium tumerfaciens*, *E. coli*, *Shewanella oneidensis*, *Stenotrophomonas* sp.; y contra las cepas fúngicas, *fungi Beauveria* spp., *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *C. albicans*. Notablemente, este péptido resultó ser altamente hemolítico produciendo el 90 % de lisis en eritrocitos de conejos a concentraciones de 25  $\mu$ M [279]. Por otro lado, BcI-14 fue similar en un 41 % a *PGLa-H*, obtenido de *X. laevis*, activo contra bacterias Gram (+) y Gram (-) [277].

Para BcI-15 se observó una similitud de secuencia del 44 % con la *Camocina UI49*, una bacteriocina aislada de la cepa *Carnobacterium piscicola UI49* [272]. Por otro lado, mostró similitud del 43 % con el fragmento del fibrinógeno (398-413) del cocodrilo *Alligator mississippiensis* [280]. Ambos péptidos han demostrado capacidad inhibitoria del crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-).

En cuanto a los péptidos de la serie BcII, el BcII-1 presentó una similitud del 45% frente a dos péptidos, la *Plantaricina GZI-27* y la *Andricina 01*. El primero es perteneciente al grupo de las bacteriocinas, y resulta activa contra bacterias Gram (+) [281]. Mientras la *Andricina 01*, fue aislado de la salamandra gigante china y ha resultado de un amplio espectro de actividad, actuando tanto contra las bacterias Gram (+): *B. subtilis*, *S. aureus*, *Listeria innocua*, *B. megaterium*; y Gram (-): *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. faecalis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, y *Salmonella Paratyphi*. Las secreciones de esta salamandra son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional [282].

BcII-2 resultó ser similar en un 42 % con la *Histona H2B-3* del pez gato del canal. Este péptido ha evidenciado actividad contra los patógenos bacterianos y fúngicos *Aeromonas hydrophila* y *Saprolegnia* spp., respectivamente. Ambos microorganismos han mostrado ser importantes agentes patógenos de mencionado pez. Este hecho ha

permitido inferir la capacidad de las histonas como moléculas defensivas [283]. Por otro lado, otra histona la *Vk25* asilada de la sangre del dragón de Komodo, y con actividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-), mostró un 40 % de similitud con BcII-2 [266].

BcII-3 presentó una similitud del 41 % con la *Plantaricina GZ1-27* anteriormente mencionada, debido a su similitud con el péptido BcII-1. Pero, además mostró un 41 y 40 % de alineamiento con dos péptidos aislados de ranas, la *Hyposina-H3* (*Phyllomedusa hypochondrialis*) [284] y el *Péptido-2* (*R. temporaria*) [271], ambos con capacidad antibacteriana contra Gram (+).

El péptido PmII-1 de la serie PmII, resultó similar en un 36 y 35 % con las secuencias de los péptidos *Crinicepsina-1* y *Brucina*, asilados de la hormiga obrera *Trichomyrmex criniceps* y la fruta del arbusto *Brucea javanica*, respectivamente. Ambos péptidos han resultado activos frente a Gram (+), el primero frente a *S. aureus* [285], y el segundo frente a *Streptococcus pyogenes* [286].



**TABLA 11.** Resultados del análisis de alineamiento de los péptidos estudiados frente a péptidos reportados en base de datos específica de péptidos bioactivos.

Análogos	Péptido Reportado	Similitud (%)	Especie <sup>(a)</sup>	Bioactividad Reportada	Alineamiento de secuencias <sup>(b)</sup>
<b>BcI-1</b>	<i>Hylaina-1</i>	41,17	<i>Hyla simplex</i> (Rana)	AntiGram (-) y Gram (+), Antifúngico	BcI-1: G + + + + S K A F A + A L L E S R Hylaina-1: G I L D A I K A F A N A + L + + G
	<i>Brevinina-1TSa</i>	40,9	<i>Rana tsushimensis</i> (Rana)	AntiGram (-) y Gram (+), Antifúngico, Hemolítico	BcI-1: + + G S + + K A F A + A L + + L E S + + R + Brevinina-1TSa: F L G S I V G A L A S A L P S L I S K I R N
<b>BcI-2</b>	<i>Coconut Peptide</i>	40	<i>Cocos nucifera</i> (Planta)	Antifúngico, Antiviral, AntiHIV	BcI-2: D P K L E E E + + R Coconut Peptide: E Q C R E E E D D R
<b>BcI-3</b>	<i>Plantaricina DL3</i>	38,09	<i>Lactobacillus plantarum DL3</i> (Bacteria)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-3: + T P G + H G A + E Y + + G A E A L + E R Plantaricina DL3: V G P G A I N A G T Y L V S R E + L F E R
<b>BcI-4</b>	<i>HD-5(1-13)</i>	40	<i>Homo sapiens</i>	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-4: R M A + C + C + + + C A P R HD-5(1-13)-: + + A T C Y C R T G R C A T R
<b>BcI-5</b>	<i>A21978C1</i>	31,25	<i>Streptomyces roseosporus</i> (Bacteria)	AntiGram (+)	BcI-5: + + D + + + D + D H S V V Y T R A21978C1: W N D T G K D A D G S + E Y + +
	<i>Lacraína</i>	30	<i>Scolopendra viridicornis</i> (Ciempiés)	AntiGram (-)	BcI-5: D D D H S V V Y T R Lacraína: + R Y P A V G Y T +
<b>BcI-6</b>	<i>Oncorincina I</i>	43,75	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Pez)	AntiGram (+)	BcI-6: S + G + K A F A K + + E + V R + Oncorincina I: S K G K K A + N K D V E L A R G
	<i>Hylaina-2</i>	40	<i>Hyla simplex</i> (Rana)	AntiGram (+) y Gram (-), Antifúngica	BcI-6: S G + + + + + K A F A K E V R Hylaina-2: + G I L D P I K A F A K A A G
<b>BcI-7</b>	<i>VK7</i>	33,3	<i>Varanus komodoensis</i> (Lagarto)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-7: E A + + + D A + + A A + G E P L P R VK7: + A K K P V A K K A A G G V K K P K
	<i>Mastoparanina-VT2</i>	33,3	<i>Vespa tropica</i> (Insecto)	AntiGram (+) y Gram (-), Antifúngico	BcI-7: + + E A D A A + A G E P L P R Mastoparanina-VT2: N L K A I A A L A + K K L + L
	<i>Alameticina</i>	33,3	<i>Trichoderma viride</i> (Hongo)	AntiGram (+), Antifúngico, Antiparasitario	BcI-7: + E A D A A + A G + E P + + L P R Alameticina: P A A A A Q A V A G L A P V A A E Q
<b>BcI-8</b>	<i>Temporina-Rb</i>	33,3	<i>Rana ridibunda</i> (Rana)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-8: T M E V V D S A G + T S T R + Temporina Rb: + F L P V + L A G V L S + R A
<b>BcI-9</b>	<i>XLAsp-P2</i>	44,89	<i>Xenopus laevis</i> (Sapo)	AntiGram (+)	BcI-9: D E D G H L L R XLAsp-P2: D E D + + L D E
	<i>Ll-1577</i>	42,85	<i>Leptodactylus latrans</i> (Rana)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-9: D E + + + D G + + + H L L R P1-Ll-1577: D E M K L D G F N M H + L E
<b>BcI-10</b>	<i>Peptido-2</i>	37,5	<i>Rana temporaria</i> (Rana)	AntiGram (+)	BcI-10: P S L G A E E N Q V L T P R + + Peptido-2: + F L G A L G N + A L + S R V L
	<i>Carnocina UI49</i>	35,71	<i>Carnobacterium piscicola UI49</i> (Bacteria)	AntiGram (+)	BcI-10: P S L G A E E N Q V L T P R Carnocina UI49: + + + G + S E I Q + + + P R
<b>BcI-11</b>	<i>Andricina B</i>	45,78	<i>Andrias davidianus</i> (Salamandra)	AntiGram (+) y Gram (-) Antifúngico	BcI-11: G + S R V F S V + R Andricina B: G L T R L F S V I K
	<i>Cn-AMP2</i>	44,45	<i>Cocos nucife</i> (Planta)	AntiGram (+), Anticancer	BcI-11: + G S + R V F S V + R Cn-AMP2: T E S Y F V F S V G M

**TABLA 11 (cont.).** Resultados del análisis de alineamiento de los péptidos estudiados frente a péptidos reportados en base de datos específica de péptidos bioactivos.

<b>BcI-12</b>	<i>Pxt-2</i>	43,75	<i>Xenopus tropicalis</i> (Sapo)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-12: P D G A P P P P V H A L K + A A Pxt-2: F I G A L L R P + + A L K L L A
	<i>PGLa-H</i>	40	<i>Xenopus laevis</i> (Sapo)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-12: P D G A P P P P V H A L K A A PGLa-H: + K I A + + + K V + A L K A L
<b>BcI-13</b>	<i>CPF-L2</i>	45,05	<i>Xenopus lenduensis</i> (Sapo)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-13: + + G S + + A F A A K L V + S P R CPF-L2: G I G S A L A K A A K L V A G I V
	<i>CPF-L1</i>	41,17	<i>Xenopus lenduensis</i> (Sapo)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-13: + + G S + + A F A A K L + V S P R CPF-L1: G I G S L L A K A A K L G A N L L
	<i>LI-2085</i>	40	<i>Laptodactylus latrans</i> (Rana)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-13: G + S A F + + A A + K + L V S + + + P R P3-LI-2085: G L L D F L K A A G K G L V S N L L E K
<b>BcI-14</b>	<i>Meucina-13</i>	42,85	<i>Mesobuthus eupeus</i> (Escorpión)	AntiGram (+) y Gram (-), Antifúngico, hemolítico	BcI-14: + S G A + A F A L L K A S R Meucina-13: I F G A I A + G L L K N I F
	<i>PGLa-H</i>	41,66	<i>Xenopus laevis</i> (Sapo)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-14: S G A A F A L L K A S R PGLa-H: K I A K V A + L K A + L
<b>BcI-15</b>	<i>Carnocina UI49</i>	44,44	<i>Carnobacterium piscicola UI49</i> (Bacteria)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-15: G S K K T K T K C P R Carnocina UI49: G S + + E I Q P R
	<i>FGG (398-413)</i>	43,75	<i>Alligator mississippiensis</i> (cocodrilo)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcI-15: G S + K K T + + K + C P + + R + FGG (398-413): Y S L K K T S M K I I P F T R L
<b>BcII-1</b>	<i>Plantaricina GZ1-27</i>	45,45	<i>Lactobacillus plantarum GZ1-27</i> (Bacteria)	AntiGram (+)	BcII-1: A S G M L G P A G + R Plantaricina GZ1-27: V S G P A G P P G T H
	<i>Andricina 01</i>	45,45	<i>Chinese giant salamander</i> (Salamandra)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcII-1: A S G + M L G P A G R Andricina 01: A I G H C L G + A T L
<b>BcII-2</b>	<i>Histona H2B-3</i>	42,85	<i>Ictalurus punctatus</i> (Pez)	Antifúngico	BcII-2: Q P + P K K T E S A + K S S K S + K + + + Histona H2B: + P D P A K T + + A P K + K K S K K A V T
	<i>VK25</i>	40	<i>Varanus komodoensis</i> (Lagarto)	AntiGram (+) y Gram (-)	BcII-2: Q P P K K T E S A K S S K S K VK25: + S P K K T K P V K P K K V A
<b>BcII-3</b>	<i>Plantaricin GZ1-27</i>	41,66	<i>Lactobacillus plantarum GZ1-27</i> (Bacteria)	AntiGram (+)	BcII-3: L A G P A G S R G G P S Plantaricin GZ1-27: V S G P A G + P P G T H
	<i>Hyposina-H3</i>	41,17	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> (Rana)	AntiGram (+)	BcII-3: L A G P A + G S R + + + + G G P S Hyposina-H3: L + G P A L I T R K P L K G K P +
	<i>Peptido-2</i>	40	<i>Rana temporaria</i> (Rana)	AntiGram (+)	BcII-3: + L + A + G P A G S R G G P S Peptido-2: F L G A L G N A L S R + + V L
<b>PmII-1</b>	<i>Crinicepsina-1</i>	36,36	<i>Trichomyrmex criniceps</i> (Hormiga)	AntiGram (+)	PmII-1: E H D G G Y G E F + Y Crinicepsina-1 -: V G V G G + G + F G R
	<i>Brucina</i>	35,71	<i>Brucea javanica</i> (Fruta)	AntiGram (+)	Brucina: + H T L C M D + G + G A T Y PmII-1: E H + + + + D G G Y G E F Y

<sup>(a)</sup> Se informa la especie según su nombre científico, y entre paréntesis su nombre coloquial. <sup>(b)</sup> El alineamiento de las secuencias peptídicas frente a secuencias reportadas fue llevado a cabo mediante el Servidor de la APBD (<http://aps.unmc.edu/AP/>).

## II.8. Estudio evolutivo de las secuencias

Con el objetivo conocer la relación evolutiva entre las secuencias peptídicas para cada serie, se realizaron estudios de alineamientos múltiples de secuencias (AMS) y un árbol filogenético. Esto fue realizado a través del servidor BLAST, utilizando una matriz de tipo BLUSUM 62. Por otro lado, el Servidor COBALT se utilizó para agrupar la información obtenida de los AMS, y en base a los parámetros de porcentaje de cobertura de identidad, y Valor de *expect* (E) del total de secuencias, se generó un árbol filogenético, que permitió apreciar de manera sencilla la cercanía evolutiva entre ellas.

La aplicación de este tipo de herramientas a los péptidos estudiados en la presente tesis nos permite a través del análisis de dominios conservados conocer la cercanía entre las secuencias, brindándonos información sobre su posible funcionalidad. Es decir, dos secuencias cercanas evolutivamente podrían llegar a poseer similar actividad biológica.

Los resultados de los AMS se muestran en la Tabla 12; mientras que de árbol filogenético evolutivo para las series BcI y BcII se muestran en la Figura 62.

Para los péptidos de la serie BcI, se pudo observar que las secuencias BcI-1, BcI-6, BcI-7, BcI-13 y, BcI-14 mostraron relación evolutiva. En base a esto se pudo observar que el péptido BcI-1 presenta mayor cercanía evolutiva con los péptidos BcI-13, BcI-6 y BcI-14, respectivamente. A su vez, estos tres péptidos también presentan una cercanía evolutiva entre ellos. El péptido BcI-7 muestra estar relacionado con BcI-13, pero con un valor de *expect* (E) de 1,7, por lo que hay posibilidad de que esa similitud sea azarosa y no significativa (ver Tabla 12). Del análisis de árbol filogenético se puede observar que los péptidos BcI-14 y BcI-6 son de una alta cercanía evolutiva. A su vez estos, poseen una cercanía con BcI-1. Estos tres péptidos poseen un ancestro en común con BcI-13 y lejanamente con BcI-7 (ver Figura 62).

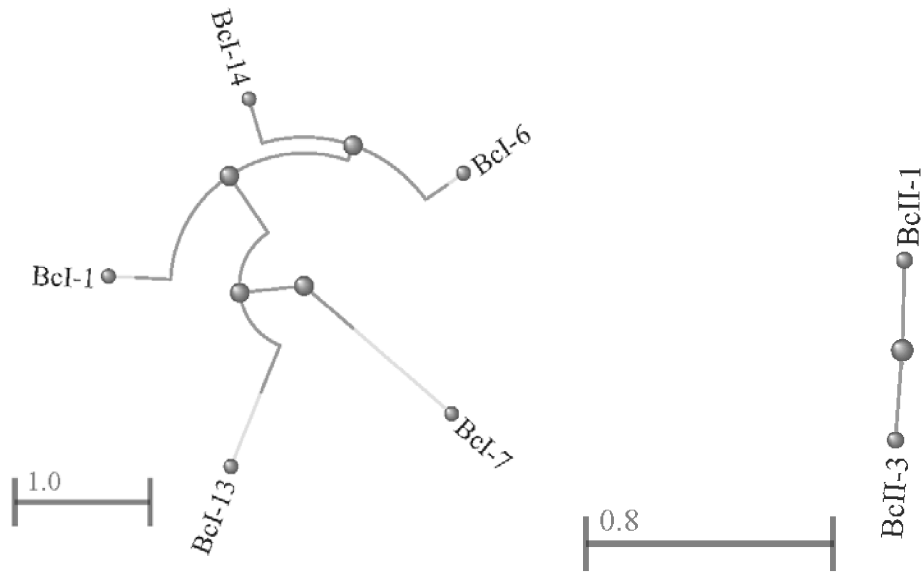
En cuanto a las secuencias de la serie BcII, se observó que los péptidos BcII-1 y BcII-3 son similares, con una identidad y una cobertura de secuencia del 100 y 40 %, respectivamente (ver Tabla 12). Esto también se visualizó en el árbol filogenético (ver Figura 62). Esta cercanía evolutiva mostró concordancia con los resultados obtenidos en la Tabla 11 en donde tanto BcII-1 como BcII-3 mostraron una similitud de secuencia con la *Plantaricina* GZI-27.

Como para la fracción PmII solo cuenta con una sola secuencia, no se pudieron realizar alineamientos.

**TABLA 12.** Datos obtenidos del alineamiento de las secuencias peptídicas de cada serie.

Péptidos	Péptido alineado	Score Total	% Cobertura	% Identidad	E valor	Alineamiento
<b>Serie BcI</b>						
<b>BcI-1</b>	<i>BcI-13</i>	15,5	58	85,71	0,012	<i>BcI-1: GSKAFAALLESR</i> <i>BcI-13: GSAFAAKLVSPR</i>
	<i>BcI-6</i>	15,1	33	100,00	0,012	<i>BcI-1: GSKAFAALLESR</i> <i>BcI-6: SGKAFK++EVR</i>
	<i>BcI-14</i>	14,2	75	66,67	0,35	<i>BcI-1: GSKAFAALLESR</i> <i>BcI-14: SGAAFALLKASR</i>
<b>BcI-2</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-3</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-4</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-5</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-6</b>	<i>BcI-1</i>	15,1	40	100,00	0,013	<i>BcI-6: SGKAFK++EVR</i> <i>BcI-1: GSKAFAALLLESR</i>
	<i>BcI-14</i>	14,2	60	83,33	0,027	<i>BcI-6: SGKAF++KEVR</i> <i>BcI-14: SGAAFALLKASR</i>
<b>BcI-7</b>	<i>BcI-13</i>	10,00	16	100,00	1,7	<i>BcI-7: EADAAAGEPLPR</i> <i>BcI-13: GSAFAAKLVSPR</i>
<b>BcI-8</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-9</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-10</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-11</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-12</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcI-13</b>	<i>BcI-1</i>	15,5	50	85,71	0,012	<i>BcI-13: GSAFAAKLVSPR</i> <i>BcI-1: GSKAFAALLESR</i>
	<i>BcI-7</i>	10	16	100	1,7	<i>BcI-13: GSAFAAKLVSPR</i> <i>BcI-7: EADAAAGEPLPR</i>
<b>BcI-14</b>	<i>BcI-6</i>	14,2	50	83,33	0,032	<i>BcI-14: SGAAFALLKASR</i> <i>BcI-6: SGKAF++KEVR</i>
	<i>BcI-1</i>	14,2	75	66,67	0,035	<i>BcI-14: SGAAFALLKASR</i> <i>BcI-1: GSKAFAALLESR</i>
<b>BcI-15</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Serie BcII</b>						
<b>BcII-1</b>	<i>BcI-3</i>	14,2	40	100	0,006	<i>BcII-1: ASGMLGPAGR++++</i> <i>BcII-3: +++LAGPAGSRGGPS</i>
<b>BcII-2</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BcII-3</b>	<i>BcI-1</i>	14,2	40	100	0,006	<i>BcII-3: +++LAGPAGSRGGPS</i> <i>BcII-1: ASGMLGPAGR++++</i>
<b>Serie PmII</b>						
<b>PmII-1</b>	-	-	-	-	-	-

\*Todos los cálculos fueron realizados mediante el Servidor BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con una matriz BLOSUM 62.



**FIGURA 62.** Árbol filogenético de la cercanía evolutiva de los péptidos realizado con el Servidor COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) a partir de los datos de AMS. Serie BcI (a la derecha), Serie BcII (a la izquierda). A menor longitud de línea, mayor cercanía evolutiva. Los puntos indican ancestros.

# CAPÍTULO III

Síntesis química y evaluación  
biológica de los análogos  
peptídicos de *B. cordobae* y *P.*  
*minuta*

Lic. Roque Spinelli

# CAPÍTULO III

## Introducción

Síntesis química y evaluación  
biológica de los análogos  
peptídicos de *B. cordobae* y *P.*  
*minuta*

Lic. Roque Spinelli

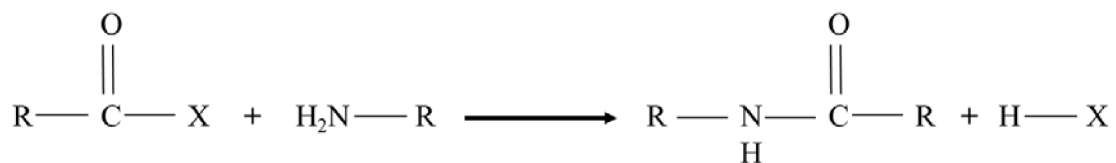
### III: INTRODUCCIÓN

Los estudios hasta aquí realizados han permitido identificar diecinueve secuencias peptídicas aisladas a partir de los extractos de las pieles de las especies *B. cordobae* y *P. minuta*, las cuales previamente mostraron ser activas frente a vías patológicas de la EA. Durante este último capítulo se aborda el proceso de síntesis química de los análogos peptídicos y su posterior evaluación y caracterización biológica.

#### III.1. Síntesis química de péptidos

La síntesis química de péptidos es una poderosa herramienta química que permite la obtención en el laboratorio de estas moléculas. Además, brinda la posibilidad de realizar modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de las secuencias, como son carga, tamaño, hidrofobicidad, etc., y en consecuencia generar un impacto en la actividad biológica y/o toxicidad de los péptidos. Así, la síntesis de péptidos constituye una tecnología de vanguardia para la medicina, ofreciendo accesibilidad al diseño racional y generación de nuevas y diversas moléculas con múltiples aplicaciones [287].

La síntesis química de péptidos requiere de la formación de enlaces amida entre los aminoácidos que forman una determinada secuencia (Figura 63).



**FIGURA 63.** Formación del enlace peptídico. X: buen grupo saliente, preferentemente un sustractor de electrones. Representación realizada con el software ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

Una de las principales dificultades de trabajar con péptidos y proteínas a partir de fuentes naturales radica en la obtención de cantidad suficiente de los mismos con elevada pureza. El aislamiento de péptidos y/o proteínas de fuentes naturales puede resultar muy laborioso y por lo general se obtiene poca cantidad del material de interés. Hoy en día, uno de los métodos biotecnológicos más utilizados para la obtención de estas moléculas es la tecnología del ADN recombinante, en la cual se realiza un clonado de los genes de interés que codifican para los péptidos/ proteínas, seguido de su expresión en un sistema huésped. Si bien representa una técnica muy poderosa, también posee su limitante, especialmente para el caso de los péptidos. Una vez expresado en el sistema, el aislamiento del péptido resulta dificultoso, y además no resulta una metodología eficiente

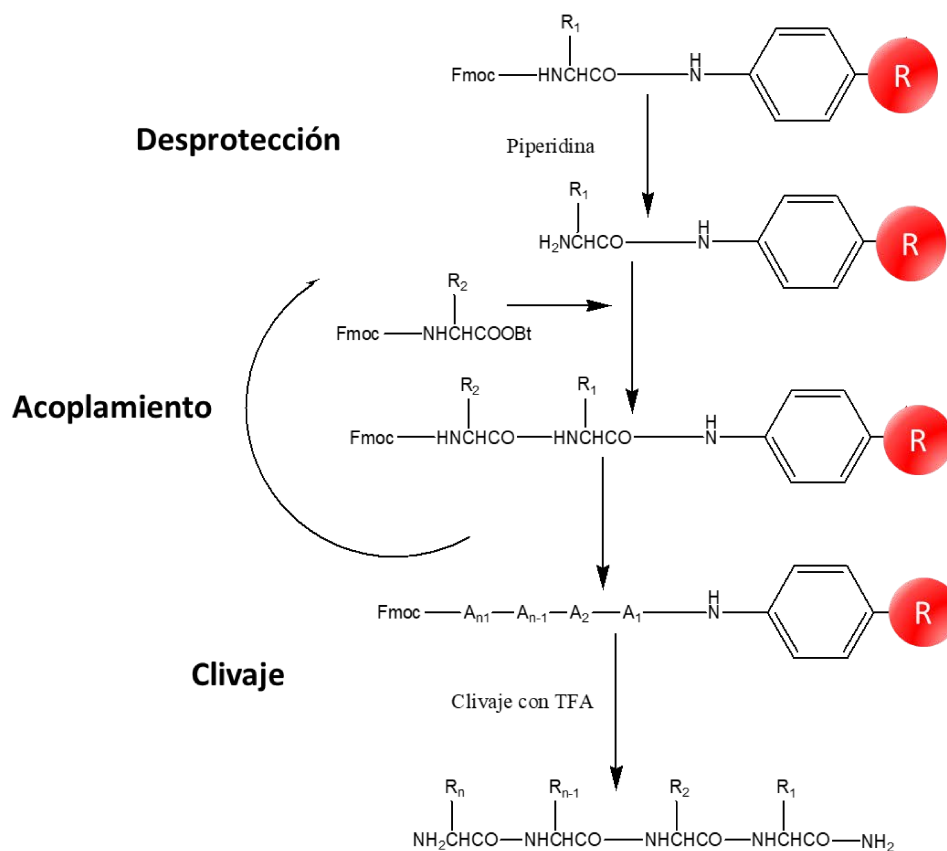


para la generación de gran diversidad de análogos [287-288]. Como método alternativo, la síntesis química de péptidos ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos 25 años [289-290].

En la década del '60, Merrifield desarrolló la síntesis de péptidos en fase sólida (en inglés, *Solid Phase Peptide Synthesis* o SPPS), trabajo por el cual le fue otorgado el Premio Nobel de Química en 1986. El protocolo de trabajo propuesto por Merrifield ha sufrido modificaciones menores con el paso de los años. Los refinamientos de la técnica se orientan principalmente al desarrollo de nuevos grupos protectores de las cadenas laterales funcionalizadas y del grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos, con el objetivo de facilitar la liberación selectiva de cada uno de estos grupos protectores [291-293].

La SPPS consiste en la adición de aminoácidos a cadenas peptídicas en crecimiento, enlazadas a un soporte sólido. La síntesis se comienza por el extremo C-terminal y avanza hacia el extremo N-terminal (sentido opuesto a como se realiza la síntesis química en solución).

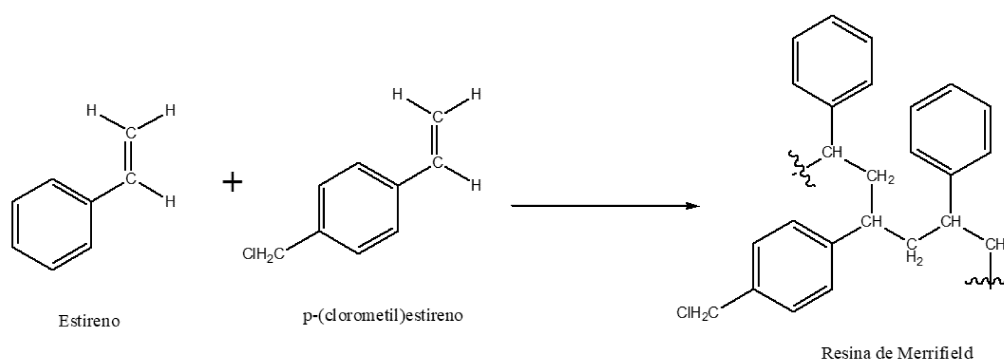
El principio de la síntesis en fase sólida se muestra en la Figura 64.



**FIGURA 64.** Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida. Representación realizada con el software ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

El aminoácido C-terminal de la secuencia a sintetizar se une covalentemente al soporte polimérico a través de su grupo carboxilo. Cualquier grupo funcional presente en las cadenas laterales de los aminoácidos debe ser enmascarado mediante la utilización de grupos protectores permanentes que no se vean afectados por las condiciones de reacción durante el acoplamiento de la cadena. Los grupos protectores temporarios que enmascaran al grupo  $\alpha$ -amino son removidos en cada etapa de desprotección. Posteriormente, se agrega un exceso del siguiente aminoácido con el grupo carboxilo activado por un agente de acoplamiento. Luego del acoplamiento, el exceso de reactivos es removido mediante lavados, y el grupo protector del residuo N-terminal es eliminado del dipéptido para dar lugar al acoplamiento del tercer aminoácido. Este proceso cíclico se repite hasta obtener la totalidad de la secuencia peptídica deseada. Como paso final, el péptido es liberado del soporte sólido que lo retiene y los grupos protectores de las cadenas laterales son removidos (ver Figura 64) [291].

El soporte sólido es poliestireno en el que algunos de los anillos aromáticos presentan grupos clorometilo. La obtención de este polímero (usualmente conocido como resina de Merrifield) se realiza mediante la copolimerización del estireno con un bajo porcentaje de p-clorometil-estireno (Chan & White, 2000) (Figura 65).



**FIGURA 65.** Formación de la resina de Merrifield. Representaciones realizadas con el software ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

Se han desarrollado dos estrategias fundamentales para la síntesis en fase sólida: la química del t-butoxicarbonilo (Boc) y la del 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc). La primera requiere del uso repetitivo de ácido trifluoroacético (TFA) durante los ciclos de elongación de la secuencia, y un tratamiento con ácido fuerte en la etapa final de síntesis, con el fin de obtener el péptido libre [294]. Como desventaja se conoce que las

condiciones ácidas utilizadas durante las etapas de desprotección en la síntesis Boc, pueden ocasionar alteraciones en los enlaces peptídicos más sensibles.

La introducción de la química Fmoc permitió realizar procesos de desprotección del grupo  $\alpha$ -amino de cada aminoácido en condiciones diferentes a las necesarias para remover los grupos protectores de las cadenas laterales y del péptido del soporte insoluble (sistema de protección ortogonal). La eliminación del protector del  $\alpha$ -amino se realiza mediante la utilización de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF), un medio básico, contrastando con la Boc que utiliza continuamente TFA. En la química Fmoc, el ácido TFA es utilizado sólo en la etapa final para la separación del péptido de la resina que lo contiene y desprotección de las cadenas laterales.

La eliminación de los subproductos de reacción y el exceso de reactivos en cada etapa se realiza por simple lavado y posterior filtración. Estas características, junto con la posibilidad de automatizar el proceso, son algunas de las ventajas que hacen a la SPPS el método de elección para la obtención de péptidos y pequeñas proteínas con secuencias específicas [291].

## III.2. Estudios computacionales

Una tarea esencial en la fase inicial de investigaciones para el descubrimiento de nuevos fármacos es adquirir conocimiento del mecanismo de acción de los compuestos bioactivos.

Para el caso de los inhibidores enzimáticos se deben de evaluar las interacciones proteína-inhibidor. Sin embargo, esto resulta una tarea de gran dificultad debido a que para conocer a nivel atómico las interacciones de complejos proteína-inhibidor, se requiere de metodologías como la cristalografía de rayos X, RMN o Cryo-EM. Estas metodologías no solo son de difícil acceso y costosas, sino que también presentan la limitación de que no todos los complejos pueden ser caracterizados, como es el caso de la cristalografía de rayos X, la cual requiere que los compuestos cristalicen.

Para superar estos problemas, se han desarrollado diversas y potentes técnicas computacionales [295-296]. Dentro de estos métodos de predicción computacionales se encuentra el *docking* molecular, que simula la interacción a nivel atómico entre una macromolécula y un ligando u otra macromolécula [297-298]. Aunque el *docking* se ha convertido en un método popular debido a los avances en la tecnología de cristalografía de

---

rayos X, que ofrece información de la disposición espacial de los átomos de las macromoléculas, la precisión de la predicción del software de este método es todavía bastante limitada. El cálculo de *docking* consta de dos pasos: primero, el programa busca la posición de unión del ligando con el bolsillo de la proteína blanco; y luego, en el segundo paso, se evalúa la afinidad de unión con una función de puntuación empírica [299]. Dicha puntuación se calcula para una sola estructura pronosticada, no teniéndose en cuenta efectos dinámicos que pueden ser esenciales [300].

Con el objetivo de superar las limitaciones de una predicción de *docking*, a esta se la puede combinar con una simulación de dinámica molecular (DM), que permite mejorar la predicción tanto de la ubicación del ligando en la enzima como de la energía libre de unión [301]. Las simulaciones de DM pueden explorar el espacio conformacional de las macromoléculas, especialmente de los estados intermedios o transitorios, que desempeñan un papel importante en el proceso de unión o disociación del ligando y la proteína [302]. Estas, involucran múltiples pasos que incluyen la aplicación de un campo de fuerza, la neutralización del sistema, la minimización de la energía y una posterior equilibración [303]. El campo de fuerza es lo que define las interacciones físicas entre los átomos y las moléculas en la simulación. En la DM se hace uso de las fuerzas que actúan entre los átomos para hacerlos mover. Esto se logra usando métodos numéricos para resolver las ecuaciones de movimiento de Newton. Las fuerzas se obtienen utilizando el gradiente de los potenciales de interacción que afectan a cada átomo. Mediante este procedimiento, es posible predecir la posición de cada uno de los átomos del sistema en un pequeño intervalo de tiempo siguiente; y a partir de estas nuevas posiciones, se calculan nuevas fuerzas y se las utilizan para actualizar las posiciones por segunda vez, y así sucesivamente. La evolución temporal de todo el sistema se puede seguir conectando cada estado con el anterior [304]. Además de la optimización conformacional del complejo de ligando-receptor, también podemos aplicar la simulación de DM en combinación con el cálculo de energía libre de enlace. Esto permite obtener parámetros para evaluar las energías libres de unión de moléculas pequeñas con enzimas blanco, y utilizarlas para clasificar moléculas candidatas con el fin de mejorar el proceso de *screening*. Actualmente, MM-PBSA (en inglés, *Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*) y MM-GBSA (en inglés, *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*) son dos metodologías de gran precisión ampliamente utilizadas para calcular la energía libre de unión entre el receptor y el ligando. Basándose en las trayectorias obtenidas por la simulación de DM, el cambio de

entalpía en todo el sistema se calcula estadísticamente a partir de la energía electrostática, la energía de Van der Waals y la energía de disolución, mientras que el cambio de entropía puede calcularse mediante análisis en modo normal. De esta manera, se puede obtener la energía libre ( $\Delta G$ ) vinculante [305]. Estos métodos calculan la diferencia de energía libre entre los estados ligados y no ligados en los sistemas ligando-receptor. Y, el proceso de sondeo, relativamente fácil, de los estados finales ha permitido que este tipo de método se utilice ampliamente en la evaluación de la afinidad de unión de varios sistemas de dos componentes [302].

# CAPÍTULO III

## Objetivos

Síntesis química y evaluación  
biológica de los análogos  
peptídicos de *B. cordobae* y *P.*  
*minuta*

Lic. Roque Spinelli

## III: OBJETIVOS

### GENERALES

- Realizar la síntesis química de los análogos peptídicos identificados a partir de los extractos de las pieles de anfibios para la evaluación de su actividad biológicas frente a los blancos terapéuticos de la Enfermedad de Alzheimer.
- Aplicar herramientas computacionales para el estudio de interacciones enzima-inhibidor.

### ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo la síntesis de los análogos peptídicos mediante síntesis en fase sólida Fmoc.
- Evaluar la actividad biológica de los análogos sintéticos, frente a las enzimas colinesterasas (AChE y BChE):
  - i. Investigar la inhibición mediante ensayos *in vitro* de punto final.
  - ii. Realizar estudios en profundidad de aquellos análogos de mayor interés:
    - ii.1. Determinar su tipo de inhibición y constante de afinidad ( $K_i$ ) mediante estudios cinéticos.
    - ii.2. Estudiar la reversibilidad del complejo enzima-inhibidor.
  - iii. Llevar a cabo estudios computacionales de *docking* flexible y dinámica molecular de los análogos de mayor actividad.
- Explorar la capacidad multi-objetivo de los análogos mediante la evaluación de la capacidad inhibitoria de la enzima MAO-B.
- Evaluar la actividad neuroprotectora de los análogos mediante la determinación de su actividad antioxidante y quelante de hierro.
- Estudiar la actividad biológica de los péptidos frente a glóbulos rojos humanos.

# CAPÍTULO III

## Materiales y Métodos

Síntesis química y evaluación  
biológica de los análogos  
peptídicos de *B. cordobae* y *P.*  
*minuta*

Lic. Roque Spinelli



### III: MATERIALES Y MÉTODOS

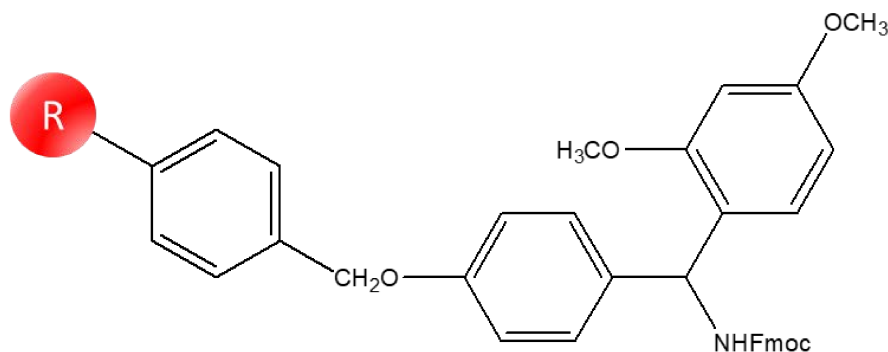
#### III.1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

##### Etapas de la síntesis y reactivos utilizados

Los péptidos fueron sintetizados en forma manual empleando la química del 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) en fase sólida [291; 293].

Los Fmoc- $\alpha$ -aminoácidos fueron adquiridos de Calbiochem-Novabiochem, Corp (California, USA) y Fluka (USA). Se emplearon los siguientes derivados: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, N-Fmoc-Asp(OtBu)-OH, N-Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, N-Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, y Fmoc-Tyr(tBu)-OH. Todos los aminoácidos utilizados fueron del tipo L-aminoácidos.

Para la síntesis de todos los análogos se utilizó la resina Rink SS 1 % DVB (Advanced Chemtech, USA), con una capacidad de 0,7 mmol/g. La estructura se muestra en la Figura 66.



**FIGURA 66.** Resina Rink SS 1 % DVB, utilizada para la síntesis de los análogos. Representación realizada con el software ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

Como solventes se utilizaron diclorometano (DCM) y N,N-dimetilformamida (DMF) previamente purificada por destilación fraccionada a presión reducida y conservada sobre tamices moleculares. Este solvente no debe contener agua o aminas, ya que el agua produce la hidrólisis de la DMF y la presencia de mínimas cantidades de

aminas en el solvente podría eliminar los grupos Fmoc de los aminoácidos. La presencia de aminas se evaluó mediante la *reacción de Sanger*<sup>(\*)</sup>.

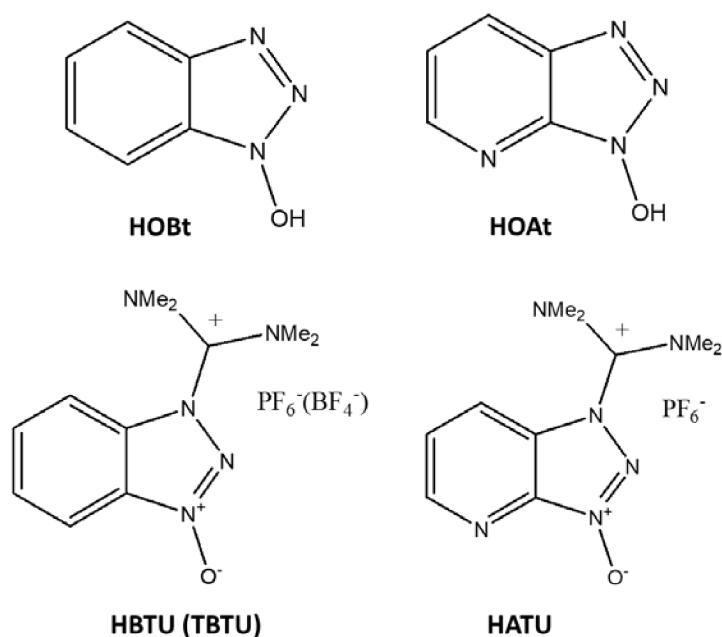
La síntesis de los análogos se realizó empleando como reactores jeringas de polipropileno, con disco filtrante de poliamida (CSPS Pharmaceuticals Inc, USA). Los péptidos se sintetizaron como amidas en el C-terminal.

La síntesis se comenzó solvatando la resina con DMF (solvente aprótico con elevada capacidad solvatante) 3 veces durante 20 min. La eliminación del grupo protector del  $\alpha$ -amino Fmoc se realizó con una solución de piperidina al 20 % en DMF, conservada sobre tamices moleculares. La etapa de acoplamiento involucra la reacción entre el grupo  $\alpha$ -amino libre del aminoácido y el grupo  $\alpha$ -carboxilo del otro aminoácido, para dar lugar al enlace peptídico (ver Figura 64). La activación de la función ácido carboxílico de cada aminoácido se efectuó con tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio (TBTU) (2 equivalentes), hidroxibenzotriazol (HOBT) (2 equivalentes), y diisopropiletilamina (DIEA) (4 equivalentes) (Figura 67). Las cantidades de aminoácidos y activadores se calculó en función de la escala de síntesis empleada, más un exceso del 100 %. La solución fue preparada previo a la reacción de acoplamiento. Durante esta etapa, la resina se mantuvo homogéneamente suspendida en la mezcla de reacción mediante agitación suave durante 40 a 60 min, repitiéndose el acoplamiento en caso de ser necesario. En algunos casos, donde el acoplamiento resulto dificultoso se reemplazaron los activadores previamente mencionados por 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridinio 3-oxid hexafluorofosphate (HATU) (2 equivalentes) y 1-hydroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) (2 equivalentes), y diisopropiletilamina (DIEA) (4 equivalentes) (ver Figura 67).

A fin de eliminar el exceso de reactivos y subproductos de reacción, luego de cada etapa se realizaron lavados con DMF.

---

<sup>(\*)</sup> Reacción de Sanger: para este ensayo, se agregaron 3,5  $\mu$ l de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) a 5 ml de etanol absoluto. Se mezclaron 1 ml de este reactivo con igual volumen de DMF a testear, e incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Paralelamente se realizó un el ensayo blanco. La presencia de aminas se detecta por el desarrollo de un color amarillo en la solución debido a la formación de la 2,4-dinitrofenilamina, mientras que una solución idéntica al blanco indica ausencia de aminas.



**FIGURA 67.** Reactivos activadores del acoplamiento de los péptidos. Representaciones realizadas con el software ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

Los controles tanto de la etapa de desprotección como de acoplamiento se realizaron mediante el *test de Kaiser* (reacción de ninhidrina)<sup>(\*\*)</sup>, que permite detectar y cuantificar con alta sensibilidad grupos aminos libres. Un correcto resultado en las etapas de síntesis se evidencia con una reacción de ninhidrina positiva en la desprotección, y negativa en el acoplamiento.

### Desprotección y clivaje

Una vez completada la secuencia, se desprotegió el grupo Fmoc del último aminoácido acoplado y se lavó con DMF, y posteriormente con DCM. Luego, se dejó secar en desecador al vacío sobre sílica gel durante 90 min. Para la eliminación de los protectores y separación de la resina del péptido se utilizó TFA en presencia de agentes de captura o *scavengers*, que poseen la función de atrapar las especies intermediarias catiónicas que son formadas durante la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales. La mezcla de clivaje empleada fue seleccionada en base a los grupos

<sup>(\*\*)</sup> Test de Kaiser o ninhidrina: La reacción de la ninhidrina puede utilizarse para la detección cualitativa o cuantitativa de grupos aminos libres, como control de las etapas de desprotección y acoplamiento, en los sucesivos ciclos de la síntesis. Es suficientemente sensible para distinguir entre un 99,8 y 99,9 % entre las reacciones de desprotección y acoplamiento.

Para la prueba, luego de los lavados en las etapas mencionadas, se toman una pequeña porción de la resina y esta es lavada con gotas de metanol, posteriormente se le agrega una gota de cada uno de los siguientes reactivos: Reactivo A (ninhidrina al 5 % en etanol absoluto), Reactivo B (8:2 de Fenol en etanol absoluto), y Reactivo C (Piridina). Seguidamente el tubo de reacción se calentó a 110 °C durante 5 min. Además, se realiza un blanco sin resina. Reacción positiva: color azul intenso, indicativo de aminos libres; reacción negativa: color amarillo [291].

protectores de las cadenas laterales y del *linker*-resina empleado, las mezclas fueron: 95 % TFA, 5 % H<sub>2</sub>O, 5 % TIS; y 94,5 % TFA, 2,5 % H<sub>2</sub>O, 0,5 % TIS, 2,5 % EDT.

El tiempo óptimo de clivaje fue determinado siguiendo la reacción mediante RP-HPLC. Los péptidos clivados fueron separados de la mezcla de reacción por precipitación en frío con éter etílico y posterior centrifugación. Luego de sucesivos lavados con éter, el producto fue resuspendido en agua Milli-Q, congelado y liofilizado.

### Purificación de los péptidos sintéticos

Los péptidos se purificaron por RP-HPLC mediante la utilización de un equipo Waters 1525 (USA) y una columna semipreparativa ZORBAX 300SB C8 Agilent (USA), de 5 µm, 9,4 x 250 mm. Se empleó un sistema de solventes constituido por, Solventes A: agua Milli-Q con 0,1 % de TFA, y Solvente B: ACN con 0,08 % de TFA. La detección se realizó mediante un detector Waters 2489 (USA) a 220 nm. Se utilizó un gradiente de elusión de 5 % de ACN durante 5 min, de 5 al 80 % hasta los 30 min, y finalmente, se mantuvo al 80 % durante 3 min. El flujo utilizado fue de 3 ml/min. Los purificados fueron evaporados a modo de eliminar el solvente, para posteriormente ser disueltos en agua Milli-Q y liofilizados.

### Espectrometría de Masas (MALDI-Tof)

Estos análisis se realizaron en colaboración con la Unidad de Proteómica y Bioquímica Analítica del Instituto Pasteur (Montevideo) con un equipo MALDI-Tof-Tof Abi Sciex 4800. Como matriz se utilizó una solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxycinámico. Solvente: ACN:H<sub>2</sub>O (50%, v/v), 0,1% TFA. Los espectros fueron calibrados externamente usando una mezcla de péptidos standard (Applied Biosystem).

## III.2. Determinación de la actividad biológica de los análogos

### Actividad enzimática de las colinesterasas

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de los análogos sintéticos frente a AChE y BChE se procedió de igual manera que lo descrito en el capítulo I (Ver Sección I.6.1, Materiales y Métodos - Capítulo I); mediante el ensayo de Ellman con pequeñas modificaciones [147]. Para ello, se utilizaron concentraciones de los análogos de 0 a 400 µM. Como control positivo se utilizó Rivastigmina [90].

## Determinación de la cinética enzimática de las colinesterasas

Los ensayos cinéticos para AChE y BChE fueron realizados de igual modo que lo descrito en la metodología del capítulo I (Ver Sección I.6.1, Materiales y Métodos - Capítulo I); siguiendo la metodología de Ellman, y determinándose los tipos de inhibición mediante el análisis de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ . Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través de las gráficas de Michaelis-Menten con el software GraphPad Prism 7.

Para los ensayos se utilizaron concentraciones de sustratos de 0,015 a 0,480 mM para la ATCI y de 0,015 a 0,500 para la BTCl. Para determinar las concentraciones óptimas a ensayar de los análogos, se tuvieron en cuenta sus valores de IC50, y en base a estos, se pusieron a punto los ensayos de manera de obtener curvas que permitieran realizar los cálculos de los parámetros cinéticos.

La constante de inhibición ( $K_i$ ) fue determinada a través del software GraphPad Prism 7, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$K_{mObs} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \rightarrow K_i = \frac{[I]}{\frac{K_{mObs}}{K_m} - 1} \quad (\text{Ecuación 16})$$

representando  $K_{mObs}$ :  $K_m$  de la enzima con inhibidor,  $K_i$ : constante de inhibición, y  $[I]$ : concentración de inhibidor (Ecuación 16).

## Determinación de la reversibilidad de la inhibición de las colinesterasas

La reversibilidad en la inhibición de las enzimas colinesterasas fue realizada siguiendo protocolos descritos por Petzer y col. [306]. Esta metodología evalúa la recuperación de la actividad enzimática luego de realizar una dilución del complejo enzima-inhibidor.

Para ello, las enzimas AChE (50 U/ml) o BChE (4 U/ml), dependiendo del caso, se preincubaron junto a concentraciones de  $10 \times K_i$  de los análogos durante 30 min a 37 °C. Seguidamente, la mezcla incubada fue disuelta 100 veces con el agregado de una solución sustrato cromógeno (0,24 mM de ATCI y 0,2 mM de DTNB para la AChE; o 0,5 mM BTCl y 0,25 mM de DTNB para la BChE). De este modo se alcanzaron concentraciones finales del inhibidor de  $0,1 K_i$ . Para el basal se utilizó agua Milli-Q en lugar del inhibidor y como control de inhibición una concentración de  $10 \times K_i$  del

inhibidor. La determinación de la actividad enzimática fue monitoreada durante 5 minutos con lecturas cada 4 s a 405 nm.

Los experimentos fueron realizados por triplicado, y el porcentaje de recuperación de la actividad fue calculado mediante la Ecuación 17:

$$\% Rec = 1 - \left( \frac{AbsM - AbsB}{AbsBa - AbsB} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 17})$$

representando AbsM, AbsB y AbsBa, la absorbancia de la muestra, el blanco y el basal, respectivamente.

### Actividad inhibitoria de la Monoamino oxidasa B (MAO-B)

La actividad inhibitoria de la enzima MAO-B frente a los análogos sintéticos fue determinada de igual manera que lo descrito en el capítulo I (Ver Sección I.6.2, Materiales y Métodos - Capítulo I), siguiendo la metodología descrita por Soto-Otero y col., con pequeñas modificaciones [148]. Para ello se utilizaron concentraciones de los análogos de 0 a 400  $\mu\text{M}$ . Como control positivo se utilizó Selegilina [106].

### Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los análogos sintéticos fue determinada mediante el método de la captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrylhydrazilo (DPPH), acorde a los ensayos descritos por Memarpoor-Yazdi con menores modificaciones, y de igual modo que lo descrito en el capítulo I (Ver Sección I.6.3, Materiales y Métodos - Capítulo I) [149]. Para ello se utilizaron concentraciones de los análogos de 0 a 800  $\mu\text{M}$ . Como control positivo se utilizó ácido ascórbico.

### Actividad quelante del hierro

La actividad quelante del ion  $\text{Fe}^{2+}$  fue determinada mediante el método descrito por He y col. [151] con pequeñas modificaciones, siguiendo lo descrito en el capítulo I (Ver Sección I.6.4, Materiales y Métodos - Capítulo I). Para ello se utilizaron concentraciones de los análogos de 0 a 1600  $\mu\text{M}$ . Como control positivo se utilizó EDTA.

### Evaluación de la actividad hemolítica

Se ensayo la actividad lítica de los análogos sobre eritrocitos humanos sanos, utilizando protocolos previamente optimizados por el grupo de trabajo [152]. Para ello,

se procedió de igual modo que los descrito en el capítulo I (Ver Sección I.7, Materiales y Métodos - Capítulo I). Se utilizaron concentraciones de los análogos de 0 a 800  $\mu\text{M}$

### III.3. Análisis de datos

El análisis de los datos para el cálculo de las bioactividades fue llevado a cabo a través del software R [153]. En todos los casos se establecieron intervalos de confianza del 95 %. Por otro lado, para la creación de las curvas de dosis respuesta, para el cálculo de los IC50 se utilizó el paquete GRmetrics [154] del proyecto Bioconductor [155]. Los gráficos fueron creados con el paquete ggplot2 [156].

### III.4. Estudios computacionales

#### Estudios interacción mediante *docking* para las colinesterasas

Se llevaron a cabo estudios de *docking* flexible de los péptidos de mayor interés. Para ello, primeramente, se realizó el modelado molecular de los péptidos mediante el software PEPFOLD 3.5 [241]. De igual manera que se elaboraron los modelos en el Capítulo II (Ver Sección II.4, Materiales y Métodos - Capítulo II). En todos los casos, se seleccionaron los modelos de mayor *score*.

Los modelos de enzimas colinesterasas utilizados para los cálculos de *docking* flexible fueron los siguientes:

Para la AChE, se utilizó una estructura correspondiente a una forma monomérica de la AChE de *Tetronarce californica* (tcAChE). No se utilizó la estructura *Electrophorus electricus* con la cual se llevaron a cabo los ensayos dado que, para la AChE de este organismo, no hay reporte de la ubicación de los residuos para los sitios PAS y subsitio aniónico, que sí se tiene para la tcAChE. Además, los modelos de AChE de *T. californica* disponibles en el *Protein Data Bank* tienen una mayor resolución que los de *E. electricus*, y considerando la alta homología entre ambas enzimas, particularmente en la zona de proximidad del sitio activo, esta es la estrategia más ampliamente utilizada para el estudio de inhibidores de AChE [307]. En base a esto, se utilizó el modelo codificado como PDB 1FSS [308]. La elección de este modelo radicó en que en esta estructura la enzima se encuentra acomplejada con el péptido *Fasciculina*, por lo que es un ligando de la misma naturaleza química que los estudiados en la presente tesis. Como residuos activos de la proteína, se seleccionaron todos los aminoácidos que conforman el sitio activo catalítico, y los cinco que conforman el sitio aniónico periférico

(PAS) (en la numeración de la tcAChE, los residuos 200, 440, 327, 84, 130, 330, 331; y 70, 72, 121, 279, 334, respectivamente). Todos los residuos del ligando peptídico fueron seleccionados como residuos activos para realizar el *docking*.

Para la BChE se utilizó un modelo de la enzima monomérica humana (hBChE), es decir la misma especie utilizada en los ensayos experimentales aquí llevados a cabo. Se eligió el modelo PDB 2PM8, ya que presenta una resolución óptima para los estudios, y además posee las ubicaciones de los residuos de la secuencia aminoacídica completa [309]. El único residuo faltante fue la Leu 455 (numeración de hBChE 2PM8) que fue agregado utilizando el servidor SWISS-MODEL (utilizando como “molde” la enzima codificada como PDB 1P0I). Los residuos activos seleccionados de la hBChE fueron aquellos correspondientes a la triada catalítica, al subsitio aniónico y al sitio PAS, que en la numeración de hBChE 2PM8 son los residuos 198, 325, 438, 82, 128, 329, 70, 332.

En todos los casos la preparación de los modelos, que consistió en la remoción de los ligandos, moléculas de agua y la adición de hidrógenos polares, se realizó con el software Discovery Studio Visualizer (Biovia). Para realizar los cálculos se utilizó el servidor HADDOCK versión Easy interface [310] con sus parámetros por defecto. Como criterio para la selección del mejor modelo de interacción se tuvo en cuenta el puntaje calculado por la función de *score* del programa (HADDOCK *score*). La configuración del mejor modelo se utilizó en las simulaciones de DM.

## Estudio de dinámica molecular

Luego de elegir el mejor modelo de interacción mediante el *docking*, se procedió a realizar estudios de dinámica molecular para cada sistema a evaluar. Inicialmente, se agregaron los átomos de hidrógeno usando LEaP de Amber 18.0 [311], y los residuos ionizables fueron protonados de acuerdo a su estado de protonación estándar a pH 7.0. Esta estructura se resolvió con una caja de agua TIP3P periódica cúbica con una distancia de margen de 10,0 Å. La carga del sistema fue neutralizada añadiendo contraiones. Para realizar estos procesos se utilizó el módulo tLEaP del paquete Amber 18.0 y el campo de fuerza ff14SB [312]. A continuación, se acondicionó el sistema para la producción. La preparación consistió en una minimización de energía de dos pasos, una termalización y un equilibrado. En el primer paso de la minimización, se relajaron solo las moléculas de solvente alrededor del complejo, restringiendo su red troncal con una limitación armónica de 10 kcal/(mol Å<sup>2</sup>). Luego, en el segundo paso se optimizó la geometría de todo el



sistema sin restricciones. Finalmente, se elevó la temperatura lentamente de 0 a 298 K, y se realizó una corrida de equilibrio de 1 ns a temperatura (termostato Langevin) y presión (barostato Berendsen) constantes [313-314]. Posteriormente, se inició la producción de 100 ns mediante la implementación en la GPU del programa PMEMD [315-316] en Amber 18.0. Para esto se utilizaron las mismas condiciones de simulación del proceso de equilibrio, que incluyeron el uso del algoritmo SHAKE [317] para la limitación de los enlaces que involucran a los hidrógenos y condiciones de contorno periódicas; y el algoritmo de Ewald [318] para la inclusión de las interacciones electrostáticas de largo alcance. Las ecuaciones de movimiento de Newton se integraron usando un paso de tiempo de 2 fs, y las fotos del sistema se guardaron cada 2 ps durante toda la producción.

Para evaluar la estabilidad del sistema se utilizó el parámetro RMSD (Raíz de la desviación cuadrática media) de todos los átomos y de los átomos del *backbone* (se consideraron los átomos C $\alpha$ , C, O y N de la estructura peptídica). El RMSD representa una medida de la estabilidad estructural que calcula la distancia promedio entre átomos de dos estructuras (Ecuación 18). Cuando se corre una dinámica molecular el sistema cambia su configuración atómica en cada paso de tiempo, por lo cual, para poder hacer un análisis confiable a partir de los resultados de la simulación se debe alcanzar la estabilidad estructural durante un tiempo considerable.

$$RMSD = \min_{T,R} \left( \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_i(t_0) - r_i(t)|^2} \right) \text{ (Ecuación 18)}$$

Siendo  $\min_{T,R}$ : minimización de la suma por roto-traslación de una estructura respecto de otra, N: número total de átomos de la estructura,  $r_i(t_0)$ : posición de  $i$ -ésimo átomo a un tiempo de referencia  $t_0$ , y  $r_i(t)$ : posición del  $i$ -ésimo átomo a cada tiempo  $t$ .

La evaluación del RMSD permite ver como fluctúa la estructura de la proteína a lo largo del tiempo de la corrida de simulación y cuanto se asemeja la ubicación de los átomos en la estructura inicial y en cada foto de la simulación de dinámica molecular. Cuanto más pequeña sea la desviación, más espacialmente equivalentes serán los dos estados (inicial y simulado), y más estable será la estructura del sistema [319].

Las trayectorias obtenidas a lo largo de los 100 ns de simulación se procesaron y estudiaron con el módulo CPPTraj del paquete Amber 18.0. Para extraer una estructura representativa de la configuración del sistema enzima-péptido se agruparon las configuraciones de los últimos 10 ns de producción en *clusters* con el algoritmo *k-means*.

Luego, se seleccionó como estructura representativa aquella más cercana a la estructura promedio del *cluster* más poblado.

Los estudios *in silico* se complementaron con un análisis MM-GBSA de descomposición de energía de interacción por residuo [320-321] para evaluar el perfil energético de la posición de unión prevista, y encontrar los residuos críticos para la formación del complejo. En este cálculo, se procesaron 50 cuadros con un intervalo de 100 ps de los últimos 20 ns de simulación. La contribución entrópica a la energía de interacción no fue considerada en los cálculos de MM-GBSA.

# CAPÍTULO III

## Resultados y Discusiones

Síntesis química y evaluación  
biológica de los análogos  
peptídicos de *B. cordobae* y *P.*  
*minuta*

Lic. Roque Spinelli

### III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### III.1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

Durante los dos primeros capítulos se evidenció la notable actividad biológica de los extractos de las especies *B. cordobae* y *P. minuta*, contra los blancos terapéuticos de la EA. Estos extractos fueron purificados por RP-HPLC, y se observó que las fracciones I y II de *B. cordobae*, y la fracción II de *P. minuta* lograron mantener la actividad biológica (ver Tabla 7, capítulo II). Posteriormente, se les realizó un estudio peptidómico a fin de secuenciar los péptidos presentes en ellas, hallándose diecinueve secuencias novedosas (ver Tabla 8, capítulo II). En este apartado, se procedió a realizar la obtención de los análogos mediante síntesis en fase sólida (Fmoc) de las diecinueve secuencias peptídicas identificadas a partir de las especies *B. cordobae* y *P. minuta*.

En la Tabla 13 se muestra la información correspondiente a los análogos sintetizados mediante síntesis en fase sólida por química Fmoc.

**TABLA 13.** Información sobre las secuencias peptídicas sintetizadas por SPPS Fmoc.

Especie	Serie	Acrónimo	Secuencia	Carga	N°	HPLC	PM
						Tr	experimental <sup>(a)</sup>
<i>B. cordobae</i>	I	BcI-1	GSKAFAALLESR-NH <sub>2</sub>	+2	12	15,99	1248,713
		BcI-2	DPKLEEER-NH <sub>2</sub>	-1	8	10,74	1014,487
		BcI-3	TPGHGAEYGAELER-NH <sub>2</sub>	-1	15	13,23	1556,887
		BcI-4	RMACCCAPR-NH <sub>2</sub>	+3	9	15,41	1025,135
		BcI-5	DDDHSVVYTR-NH <sub>2</sub>	-1	10	11,28	1205,974
		BcI-6	SGKAFKEVR-NH <sub>2</sub>	+3	10	11,52	1091,565
		BcI-7	EADAAAGEPLPR-NH <sub>2</sub>	-1	12	12,12	1195,031
		BcI-8	TMEVVDSAGTSTR-NH <sub>2</sub>	0	13	13,73	1368,981
		BcI-9	DEDGHLLR-NH <sub>2</sub>	-1	8	11,64	953,112
		BcI-10	PSLGAEENQVLTTPR-NH <sub>2</sub>	0	14	14,25	1509,543
		BcI-11	GSRVFSVR-NH <sub>2</sub>	+3	8	12,24	906,010
		BcI-12	PDGAPPPVHALKAA-NH <sub>2</sub>	+1	15	13,59	1436,111
		BcI-13	GSAFAAKLVSPR-NH <sub>2</sub>	+3	12	13,74	1202,122
		BcI-14	SGAAFALLKASR-NH <sub>2</sub>	+3	12	15,72	1190,886
		BcI-15	GSKKTKCPR-NH <sub>2</sub>	+5	9	14,01	1003,432
<i>B. cordobae</i>	II	BcII-1	ASGMLGPAGR-NH <sub>2</sub>	+2	10	19,28	931,631
		BcII-2	QPPKKTESAKSSKSK-NH <sub>2</sub>	+5	15	4,43	1629,906
		BcII-3	LAGPAGSRGGPS-NH <sub>2</sub>	+2	12	17,90	1025,223
<i>P. minuta</i>	II	PmII-1	EHDGGYGEFY-NH <sub>2</sub>	-2	10	20,34	1172,534

(a) Correspondientes al Ion [M]<sup>+</sup>, determinado por Espectrometría de Masas MALDI-Tof. Tr: Tiempo de retención en el análisis mediante RP-HPLC (C18)

Todos los análogos fueron sintetizados de forma amida en su extremo C-terminal, ya que los estudios peptidómicos realizados demostraron que los péptidos son de esta característica. Las secuencias sintetizadas fueron analizadas y purificadas por HPLC en fase reversa a modo de obtener una pureza superior al 90 % (Figura A5, Material Anexo). Por otro lado, los pesos moleculares de las secuencias sintéticas fueron confirmados mediante espectrometría de masas MALDI-Tof (ver Tabla 13).

## III.2. Evaluación biológica de los análogos sintéticos

### Capacidad hemolítica de los análogos

La Tabla 14 muestra los valores de actividad para los análogos peptídicos estudiados, expresados como HC50 (concentración hemolítica 50). Las curvas de dosis respuesta son mostradas en las Figuras A6 del Material Anexo. Los resultados mostraron que los análogos son de una variada actividad hemolítica.

Estudios realizados en péptidos han demostrado que el aumento de la cationicidad, hidrofobicidad y anfipaticidad promueven capacidad de interacción con membranas celulares y la actividad hemolítica [322]. La *Melitina*, una potente toxina aislada a partir del veneno de la abeja es un péptido altamente hemolítico [323], el cual posee una estructura helicoidal y elevada hidrofobicidad, alcanzando el 50 % de hemólisis a una concentración de 0,6  $\mu\text{M}$  [324]. Para el caso de los péptidos estudiados en la presente tesis este fenómeno no fue estrictamente evidenciado, ya que la correlación entre la actividad hemolítica y las propiedades fisicoquímicas no pudieron correlacionarse para la mayoría de los análogos. Como ejemplo, los estudios fisicoquímicos *in silico* para BcI-4 mostraron que posee el 66 % de residuos hidrofóbicos ( $H= 0.26$ ), 55 % de estructura helicoidal y una carga de +3, no resultando hemolítico en el rango de concentraciones ensayadas. Además, BcI-14 con 58 % de residuos hidrofóbicos ( $H= 0,6$ ), 83 % de hélice en su estructura y carga +3, tampoco resultó hemolítico. Por otro lado, BcI-5, con 30 % de residuos hidrofóbicos ( $H= -1,26$ ), sin estructura secundaria y una carga de -1 presentó relativa actividad hemolítica (ver Tabla 10, capítulo II). Uno de los casos en los cuales se pudo asociar la hemólisis a las propiedades fisicoquímicas fue BcI-13. Este presenta un 50 % de residuos hidrofóbicos ( $H=0,35$ ), 75 % de hélice en su estructura y una carga +3, mostrando una moderada actividad hemolítica con un valor de HC50 de 129,86  $\mu\text{M}$  (ver Tabla 10, capítulo II).

**TABLA 14.** Datos de actividad hemolítica de los análogos.

Péptidos	Secuencia	HC50 (µM) <sup>(a)</sup>
		Hemólisis
BcI-1	<i>GSKAFAALLESR-am</i>	148,32 ± 8,14
BcI-2	<i>DPKLEER-am</i>	38,54 ± 0,77
BcI-3	<i>TPGHGAEYGAEALER-am</i>	67,89 ± 1,00
BcI-4	<i>RMACCCAPR-am</i>	>800
BcI-5	<i>DDDHSVVYTR-am</i>	190,39 ± 3,36
BcI-6	<i>SGKAFAKEVR-am</i>	88,82 ± 0,79
BcI-7	<i>EADAAAGEPLPR-am</i>	83,81 ± 5,04
BcI-8	<i>TMEVVDSAGTSTR-am</i>	70,49 ± 1,10
BcI-9	<i>DEDGHLR-am</i>	74,91 ± 0,47
BcI-10	<i>PSLGAEENQVLTPR-am</i>	73,97 ± 4,66
BcI-11	<i>GSRVFSVR-am</i>	271,15 ± 5,03
BcI-12	<i>PDGAPPPVHALKAA-am</i>	276,83 ± 10,99
BcI-13	<i>GSAFAAKLVSPR-am</i>	129,86 ± 3,34
BcI-14	<i>SGAAFALLKASR-am</i>	>800
BcI-15	<i>GSKKTKCPR-am</i>	>800
BcII-1	<i>ASGMLGPAGR-am</i>	378,31 ± 25,62
BcII-2	<i>QPPKTESAKSSKSK-am</i>	124,30 ± 5,04
BcII-3	<i>LAGPAGSRGGPS-am</i>	>800
PmII-1	<i>EHDGGYGEFY-am</i>	>800

<sup>(a)</sup> Los valores de HC50 fueron determinados mediante el análisis de regresión de triplicados. Todos los valores fueron expresados con un intervalo de confianza del 95 %.

Si bien los péptidos aislados de pieles de anfibios han demostrado tener su limitante de aplicación en el hecho de que resultan líticos para los glóbulos rojos, varios péptidos aislados de la familia Hylidae han demostrado ser poco hemolíticos, como ejemplo se pueden mencionar las Hylinas, aisladas de *H. biobeba* [7; 214; 325].

### III.3. Actividad de los análogos frente a las vías de la EA

Con el fin de evaluar la bioactividad de los análogos sintéticos como agentes multiobjetivos contra la EA, se llevaron a cabo los siguientes ensayos biológicos.

#### III.3.1. Capacidad neuroprotectora de los análogos

El cerebro de pacientes con EA presenta un extenso deterioro debido al estrés oxidativo. La sobreproducción de ROS por parte de los depósitos del péptido Aβ, la actividad exacerbada de la MAO-B, así como el desbalance de iones metálicos representan las principales causas de esta problemática [111]. Por lo que, la utilización de agentes tanto antioxidantes como quelantes han sido utilizados como neuroprotectores.

### Actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante fue llevada a cabo mediante la evaluación de la capacidad de los análogos de capturar al radical libre DPPH. Los resultados de actividad antioxidante para los análogos sintéticos, expresados como valores de EC50, se muestran en la Tabla 15. Las curvas de dosis respuesta de la inhibición mediante las cuales se calcularon los valores de EC50 se muestran en la Figura A7 del Material Anexo.

Solo análogos pertenecientes a la serie BcI mostraron la capacidad de capturar al radical libre DPPH. De ellos, los péptidos BcI-15 y BcI-4 fueron los que demostraron una mayor capacidad antioxidante, con valores de EC50 de 7,24 y 83,42  $\mu$ M, respectivamente. En menor medida los análogos BcI-8, BcI-7 y BcI-1, fueron activos con valores de EC50 que rondaron los 200  $\mu$ M. Notablemente la actividad antioxidante del péptido BcI-15 fue superior que el ácido ascórbico (EC50 = 39,50  $\mu$ M).

**TABLA 15.** Datos de actividad antioxidante y quelante de los análogos.

Péptidos	Secuencia	EC50 ( $\mu$ M) <sup>(a)</sup>	
		Actividad Antioxidante	Actividad Quelante
BcI-1	<i>GSKAFAALLESR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-2	<i>DPKLEER-am</i>	285,40 $\pm$ 9,01	NAQ
BcI-3	<i>TPGHGAEYGAELER-am</i>	566,83 $\pm$ 12,64	NAQ
BcI-4	<i>RMACCCAPR-am</i>	83,42 $\pm$ 3,87	785,00 $\pm$ 9,77
BcI-5	<i>DDDHSVVYTR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-6	<i>SGKAFAKEVR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-7	<i>EADAAAGEPLPR-am</i>	277,73 $\pm$ 5,00	NAQ
BcI-8	<i>TMEVVDSAGTSTR-am</i>	227,59 $\pm$ 0,55	NAQ
BcI-9	<i>DEDGHLLR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-10	<i>PSLGAEENQVLTPR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-11	<i>GSRVFSVR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-12	<i>PDGAPPPVHALKAA-am</i>	NAA	NAQ
BcI-13	<i>GSAFAAKLVSPR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-14	<i>SGAAFALLKASR-am</i>	NAA	NAQ
BcI-15	<i>GSKKTKCPR-am</i>	7,24 $\pm$ 0,51	NAQ
BcII-1	<i>ASGMLGPAGR-am</i>	NAA	NAQ
BcII-2	<i>QPPKKTESAKSSKSK-am</i>	NAA	NAQ
BcII-3	<i>LAGPAGSRGGPS-am</i>	NAA	NAQ
PmII-1	<i>EHDGGYGEFY-am</i>	NAA	1510,14 $\pm$ 13,61
C+	<i>Ácido ascórbico</i>	39,50 $\pm$ 0,21	-
	<i>EDTA</i>	-	424,40 $\pm$ 10,04

<sup>(a)</sup> Los valores de IC50 fueron determinados mediante el análisis de regresión de triplicados. Todos los valores fueron expresados con un intervalo de confianza del 95 %. NAA: No actividad antioxidante. NAQ: No actividad quelante. C+: control positivo.

La potencialidad defensiva de los péptidos presentes en las pieles de los anfibios continúa siendo ampliamente estudiada. Como se mencionó en el capítulo I, la piel de los anfibios al estar expuesta a las ROS del medio externo ha desarrollado un eficaz sistema de defensa antioxidante [60; 202]. Una de las notables características de los péptidos antioxidantes de las pieles de los anfibios, es su rápida velocidad de acción que protege al animal; ya que son capaces de neutralizar a los radicales libres en cortos periodos de tiempo. Dicho fenómeno fue evidenciado para los análogos BcI-15 y BcI-4, puesto de manifiesto por el rápido viraje de color del DPPH al momento de la reacción con estos análogos.

Por otro lado, estudios genéticos demostraron que los péptidos antioxidantes son capaces de evolucionar su secuencia como producto de la presión selectiva ejercida por las ROS presentes en cada entorno, dando así origen a una gran diversidad de estos [60].

La relación estructura actividad resulta un eje central en la capacidad antioxidante de los péptidos, siendo su hidrofobicidad, su peso molecular, así como también la composición y el orden de los aminoácidos, características claves [326]. Se ha demostrado que los péptidos con capacidad antioxidante son principalmente de bajo peso molecular, y están constituidos por elevado número de aminoácidos hidrofóbicos. Además, se conoce que el anillo de pirrolidina e indólico de la Pro y el Trp, respectivamente, así como los anillos aromáticos del Trp, Phe y Tyr, son capaces de donar electrones actuando como capturadores de radicales libres [326-327]. En adición a esto, se ha reportado que residuos como Gly, Ile y Val ayudan a conformar un ambiente hidrofóbico potenciando la capacidad antioxidante de los péptidos [326].

Por otro lado, diversos estudios posicionan a la Cys como el residuo clave y de mayor poder antioxidante, siendo el responsable la rápida acción capturadora radicales libres de los péptidos [202; 326]. Esto es debido a que el grupo sulfhidrilo (-SH) que posee es de elevado poder reductor, el cual actúa como dador de protones. Además, la Cys es capaz de donar electrones de su átomo de azufre. Cabe mencionar que la actividad antioxidante de la Cys se da cuando el aminoácido se encuentra en su forma libre y no cuando forma enlaces de tipo puente disulfuro [202; 326].

Del análisis de las secuencias de los análogos de mayor actividad antioxidante, se pudo observar que tanto BcI-15 como BcI-4 poseen residuos Pro y Cys en sus secuencias.



BcI-15, el más activo, posee una Cys y una Pro consecutivas. Este hecho también es observado en el potente péptido antioxidante *Antioxidina-RP1* (AMRLTYNKPCLYGT-NH<sub>2</sub>) (EC<sub>50</sub>= 12,27 μM) aislado de la piel de la rana *P. nattereri* [40]. Por su parte, BcI-4 posee tres residuos de Cys consecutivos y una Pro en su secuencia. Además, los análisis de hidrofobicidad mostraron que BcI-4 posee apreciable hidrofobicidad con un 66 % de residuos hidrofóbicos, hecho que genera un ambiente adecuado para la actividad antioxidante (ver Tabla 10, capítulo II).

Cabe destacar que, de todos los análogos estudiados, solamente BcI-4 y BcI-15 son los únicos que contienen residuos de Cys, hecho que refuerza lo descrito en bibliografía.

### Actividad Quelante del ion Fe<sup>2+</sup>

Los péptidos y proteínas han demostrado poseer actividad quelante de iones metálicos. Esta capacidad se basa en interacciones de tipo proteína-metal, dependiendo principalmente de la composición de los aminoácidos y de la disposición espacial de estos para poder formar las interacciones electrostáticas o de puente de hidrógeno. Residuos tales como Cys, Ser, His, Trp, Tyr, Met, Arg, Asp y Glu han demostrado ser buenos ligandos para la unión de metales de transición [210; 213]. Por otro lado, residuos cargados negativamente son capaces de promover las interacciones electrostáticas con iones metálicos cargados positivamente [210].

Los resultados de la actividad quelante del Fe<sup>2+</sup> por parte de los análogos son mostrados en la Tabla 15. Las curvas de dosis respuesta de la inhibición mediante las cual se calcularon los EC<sub>50</sub> se muestran en la Figura A8 del Material Anexo.

De los análogos estudiados de la especie *B. cordobae*, solamente BcI-4 mostró la capacidad de quelar el ion Fe<sup>2+</sup>; con un valor de EC<sub>50</sub> de 785 μM. Analizando la estructura de este péptido, y teniendo en cuenta lo reportado en la bibliografía, podemos observar que su secuencia posee dos residuos Arg, tres Cys y una Met. Estructuralmente, el péptido posee un giro de α hélice comprendido entre la Met<sub>2</sub> y la Ala<sub>7</sub>. En esta, se puede observar que los residuos de Met<sub>2</sub>, Cys<sub>4</sub> y Cys<sub>6</sub> quedan orientados espacialmente hacia afuera de la hélice, estando disponibles para generar interacciones con el ion metálico; además la Arg<sub>1</sub> y Arg<sub>9</sub>, en ambos extremos de la cadena peptídica, también se encuentran disponibles (ver Figura 61, capítulo II).

Por otro lado, el análogo PmII-1 de *P. minuta* también presentó actividad quelante del metal  $\text{Fe}^{2+}$ , con un valor de EC50 de 1510  $\mu\text{M}$ . Este péptido está constituido por varios residuos con capacidad quelante demostrada. Su secuencia presenta dos Glu, una His, un Asp, y dos Tyr. Además, este péptido posee una carga neta negativa de -2, hecho favorable para la interacción con iones metálicos cargados positivamente. En cuanto a su estructura, PmII-1 no presenta estructura secundaria, por lo cual los residuos mencionados estarían disponibles para lograr una interacción con el ion metálico  $\text{Fe}^{2+}$  (ver Figura 61, Capítulo II).

El EDTA utilizado como control positivo mostró una capacidad quelante con un EC de 424,40  $\mu\text{M}$ .

El efecto neuroprotector que otorga la utilización tanto de agentes antioxidantes como quelantes, juega un rol clave en la patología y evolución de la EA. Por lo cual, el hecho que los análogos estudiados hayan mostrado la capacidad reguladora de estas actividades biológicas resulta sumamente prometedor.

### III.3.2. Actividad inhibitoria frente a la MAO-B

A modo de evaluar si los análogos sintéticos eran capaces de actuar como agentes inhibidores de la enzima MAO-B, se evaluó su actividad. En la Tabla 16 se presentan los resultados de inhibición de los análogos frente a la MAO-B, expresados como valores de IC50. Las curvas de dosis respuesta de la inhibición mediante las cuales se calcularon los IC50 se muestran en la Figura A9 del Material Anexo.

Se pudo observar que solamente péptidos identificados de la serie BcI resultaron activos frente a la MAO-B. Siendo el de mayor actividad inhibitoria BcI-4 con un valor de IC50 de 150,64  $\mu\text{M}$ ; seguido por los análogos BcI-13, BcI-14 y BcI-15 con valores de IC50 194,82; 200,54 y 570,19, respectivamente.

TABLA 16. Datos de inhibición de los análogos frente a la enzima MAO-B.

Péptidos	Secuencia	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>(a)</sup>
		MAO-B
BcI-1	<i>GSKAFAALLESR-am</i>	NI
BcI-2	<i>DPKLEEER-am</i>	NI
BcI-3	<i>TPGHGAEYGAALER-am</i>	NI
BcI-4	<i>RMACCCAPR-am</i>	150,64 ± 1,00
BcI-5	<i>DDHHSVYTR-am</i>	NI
BcI-6	<i>SGKAFAKEVR-am</i>	NI
BcI-7	<i>EADAAAGEPLPR-am</i>	NI
BcI-8	<i>TMEVVDSAGTSTR-am</i>	NI
BcI-9	<i>DEdGHLLR-am</i>	NI
BcI-10	<i>PSLGAEENQVLTPR-am</i>	NI
BcI-11	<i>GSRVFSVR-am</i>	NI
BcI-12	<i>PDGAPPPVHALKAA-am</i>	NI
BcI-13	<i>GSAFAAKLVSPR-am</i>	194,82 ± 2,11
BcI-14	<i>SGAAFALLKASR-am</i>	200,54 ± 10,05
BcI-15	<i>GSKKTKCPR-am</i>	570,19 ± 8,57
BcII-1	<i>ASGMLGPAGR-am</i>	NI
BcII-2	<i>QPPKKTESAKSSKSK-am</i>	NI
BcII-3	<i>LAGPAGSRGGPS-am</i>	NI
PmII-1	<i>EHDGGYGEFY-am</i>	NI
C+	<i>Selegilina</i>	0,015 ± 0,00

<sup>(a)</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> fueron determinados mediante el análisis de regresión de triplicados. Todos los valores fueron expresados con un intervalo de confianza del 95 %. NI: ni inhibe. C+: control positivo.

Actualmente, solo se cuenta con cuatro fármacos aprobados por la FDA como inhibidores selectivos y mixtos de las MAOs, la Selegilina, la Isocarboxazida, la Tranilcipromina y la Fenelzina [328]. Dentro de ellos, la Selegilina o *Deprenyl*, es el más utilizado debido a su selectividad para la MAO-B, y a que no se han reportado efectos secundarios severos. La administración clínica de Selegilina en pacientes con EA ha demostrado enlentecer la sintomatología de esta enfermedad, por lo cual se la utiliza en su tratamiento [106; 329]. La Selegilina posee una elevada capacidad inhibitoria de la MAO-B con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 11 y 5 nM [330].

El escaso número de drogas aprobadas, así como su amplio campo de aplicabilidad hace que las investigaciones en la búsqueda de inhibidores de la MAO-B sea un área activa de las ciencias médicas actuales. Hasta la fecha no se han reportado péptidos con la capacidad de inhibir la actividad de la MAO-B. Es por este motivo, que el hecho de que los péptidos aquí estudiados muestren la capacidad de inhibir esta enzima

resulta sumamente alentador, y abre las puertas para continuar con las investigaciones en esta área.

### III.3.3. Actividad biológica frente a la AChE y BChE

La capacidad inhibitoria de los análogos sintéticos frente a las enzimas colinesterasas, AChE y BChE fue evaluada. En la Tabla 17 se muestran los resultados de inhibición obtenidos expresados como IC<sub>50</sub> (μM). Las curvas de dosis respuesta de la inhibición mediante las cuales se calcularon los IC<sub>50</sub> se muestran en las Figuras A10, A11 y A12 del Material Anexo.

**TABLA 17.** Datos de inhibición de los análogos frente a las enzimas colinesterasas (AChE y BChE).

Péptidos	Secuencia	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>(a)</sup>	
		AChE	BChE
BcI-1	<i>GSKAFAALLESR- NH<sub>2</sub></i>	NI	NI
BcI-2	<i>DPKLEER- NH<sub>2</sub></i>	338,55 ± 10,00	499,43 ± 9,00
BcI-3	<i>TPGHGAEYGAEALER- NH<sub>2</sub></i>	310,52 ± 2,00	NI
BcI-4	<i>RMACCCAPR- NH<sub>2</sub></i>	0,90 ± 0,40	NI
BcI-5	<i>DDDHSVVYTR- NH<sub>2</sub></i>	NI	0,82 ± 0,05
BcI-6	<i>SGKAFAKEVR- NH<sub>2</sub></i>	NI	372,75 ± 17,00
BcI-7	<i>EADAAAGEPLPR- NH<sub>2</sub></i>	272,96 ± 15,00	486,13 ± 20,00
BcI-8	<i>TMEVVDSAGTSTR- NH<sub>2</sub></i>	NI	124,55 ± 3,00
BcI-9	<i>DEDGHLLR- NH<sub>2</sub></i>	NI	290,73 ± 4,00
BcI-10	<i>PSLGAEENQVLTPR- NH<sub>2</sub></i>	NI	NI
BcI-11	<i>GSRVFSVR- NH<sub>2</sub></i>	NI	NI
BcI-12	<i>PDGAPPPVHALKAA- NH<sub>2</sub></i>	NI	NI
BcI-13	<i>GSAFAAKLVSPR- NH<sub>2</sub></i>	NI	14,42 ± 1,00
BcI-14	<i>SGAAFALLKASR- NH<sub>2</sub></i>	NI	2,12 ± 0,00
BcI-15	<i>GSKKTKCPR- NH<sub>2</sub></i>	669,06 ± 12,00	NI
BcII-1	<i>ASGMLGPAGR- NH<sub>2</sub></i>	509,15 ± 22,00	NI
BcII-2	<i>QPPKKTESAKSSKSK- NH<sub>2</sub></i>	NI	NI
BcII-3	<i>LAGPAGSRGGPS- NH<sub>2</sub></i>	214,57 ± 33,00	NI
PmII-1	<i>EHDGGYGEFY- NH<sub>2</sub></i>	NI	NI
C +	<i>Rivastigmina</i>	34,17 ± 6,00	0,08 ± 0

<sup>(a)</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> fueron determinados mediante el análisis de regresión de triplicados. Todos los valores fueron expresados con un intervalo de confianza del 95 %. NI: no inhibe. C+: control positivo

Del análisis de dicha actividad biológica, se observó que solamente los análogos pertenecientes a la especie *B. cordobae* fueron capaces de inhibir la actividad de las colinesterasas, no así el péptido obtenido de *P. minuta*.

De los péptidos de la serie BcI, cuatro presentaron una notable actividad inhibitoria frente a la AChE, BcI-4, BcI-7, BcI-3 y BcI-2, con valores de IC<sub>50</sub> de 0,904;

272,96; 310,52 y 338,55  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La Rivastigmina, fármaco inhibidor de la AChE recetado para pacientes que padecen la EA, y utilizado como control positivo en los ensayos aquí realizados, presentó valores de IC<sub>50</sub> de 34,17  $\mu\text{M}$ . Interesantemente, el análogo BcI-4 mostró un potencial inhibitorio superior al de la Rivastigmina, superando su actividad en dos órdenes de magnitud.

En relación a la BChE, ocho de los quince péptidos de BcI presentaron capacidad inhibitoria frente a esta enzima, siendo los de mayor potencia inhibitoria BcI-5, BcI-14 y BcI-13, con valores de IC<sub>50</sub> de 0,82; 2,12 y 14,42  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

En lo que respecta a los análogos de la serie BcII, estos presentaron actividad selectiva para la AChE, no mostrando inhibición en ninguno de los casos frente a la BChE. Dentro de estos, el de mayor capacidad inhibitoria fue BcII-3 con un valor de IC<sub>50</sub> de 214,57  $\mu\text{M}$ .

En cuanto al péptido identificado de la serie PmII, no se observó actividad frente a las colinesterasas dentro del rango de concentraciones ensayadas. Este hecho podría deberse a que los compuestos inhibidores presentes en el extracto activo no sean de naturaleza peptídica.

Varios péptidos de origen natural han demostrado poseer inhibición frente a las enzimas AChE y BChE. Ente ellos, las *Fasciculinas*, aisladas del veneno de la mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*), fueron los péptidos naturales con mayor capacidad inhibitoria de ambas colinesterasas hasta la fecha reportados. Pero, su aplicación como molécula farmacológica se vio afectada debido a la alta toxicidad que estos poseen [182]. Por otro lado, la *Snakina-Z*; un péptido catiónico aislado del fruto de la planta arbórea china *Zizyphus jujube*, ha demostrado poseer la capacidad de inhibir tanto a la AChE como a la BChE, con valores de IC<sub>50</sub> de 175 y 217  $\mu\text{M}$ , respectivamente [331]. Las pieles de anfibios también han demostrado ser poseedoras de péptidos con capacidad inhibitoria de las colinesterasas, con dos secuencias reportadas. Estos péptidos son los ya mencionados *Hp-1971* y *Hp-1935*, aislados a partir de la especie de rana *B. pulchella*. *Hp-1971* es poseedor de una moderada actividad anticolinesterásica dual, inhibiendo principalmente BChE y en menor medida AChE, con porcentajes de inhibición del 35 y 20 % a una concentración de 400  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Por su parte, *Hp-1935* ha

demostrado ser activo solamente frente a la AChE con un valor de IC<sub>50</sub> de 89,8  $\mu$ M [43; 61].

Como se puede observar algunos de los péptidos estudiados en la presente tesis mostraron una potente actividad inhibitoria frente a las colinesterasas, superando a los diferentes péptidos naturales actualmente reportados en bibliografía, como es el caso de BcI-4, BcI-5, BcI-13 y BcI-14. Además, se observó que varios de los análogos estudiados presentaron la capacidad de inhibir de manera dual ambas colinesterasas (ver Tabla 17), otro hecho de suma relevancia, ya que al lograr inhibir tanto la AChE como a la BChE, se estaría logrando una modulación general de la actividad colinérgica.

Por otro lado, la compleja pato-fisiología multifactorial de la EA, requiere de estrategias multiobjetivo como terapia. Como se mencionó durante el capítulo I, las colinesterasas y la MAO-B están estrechamente asociadas con la sintomatología y progresión de la EA, por lo cual se han abordado diversas investigaciones enfocadas a ligandos capaces de actuar sobre ambas familias de enzimas [185-186]. Esta estrategia ofrece grandes posibilidades de alterar el curso de la enfermedad, además del alivio de los síntomas [184]. En relación a esto, los estudios llevados a cabo en la presente tesis mostraron que el péptido BcI-4 que logró inhibir con gran potencia la AChE, además resulto ser el de mayor actividad frente a la MAO-B (ver Tabla 16). En adición, los análogos BcI-13 y BcI-14 fueron activos contra BChE y MAO-B (ver Tabla 16 y Tabla 17). Estos péptidos presentan prometedores resultados al actuar como inhibidores de las dos familias de enzimas principales en la patología de la AE.

### **Cinética de inhibición de los análogos frente a la AChE y BChE**

Debido a los prometedores resultados obtenidos frente a las colinesterasas, se decidieron llevar a cabo estudios en profundidad a modo de comprender mejor la mecánica de la inhibición.

Aunque los resultados de bioactividad mostraron que una gran parte de los análogos fueron activos frente a estas enzimas, cuatro de ellos, BcI-4, BcI-5, BcI-13 y BcI-14, resultaron los de mayor actividad biológica. Cabe mencionar, que si bien, estos cuatro péptidos no mostraron actividad dual sobre ambas colinesterasas, su potencia de inhibición fue superadora frente a aquellos análogos que sí; incluso resultaron, en algunos casos, de mayor actividad que el fármaco Rivastigmina utilizado como control positivo

---

(ver Tabla 17). Es por esto, que los péptidos BcI-4, BcI-5, BcI-13 y BcI-14 fueron seleccionados para la evaluación de su mecanismo de acción frente a las colinesterasas.

Para ello, se llevó a cabo un análisis de los parámetros  $K_m$  y  $V_{max}$ , obtenidos a partir curvas de velocidad de sustrato (Michaelis-Menten) en presencia y ausencia de los análogos inhibidores. Las concentraciones a las cuales se ensayaron los análogos fueron seleccionadas según sus valores de  $IC_{50}$ . Cabe mencionar que en base a los resultados de inhibición obtenidos en la Tabla 17, el análogo BcI-4 fue evaluado frente a la AChE y BcI-5, BcI-13 y BcI-14 frente a BChE.

Al igual que lo realizado en el capítulo 1, el tipo de inhibición fue determinada a través del análisis de significancia de los parámetros  $K_m$  y  $V_{max}$ , en presencia y ausencia de inhibidores mediante un test de ANOVA a una vía. Adicionalmente, se obtuvieron los valores de constante de inhibición ( $K_i$ ). A diferencia de los valores de  $IC_{50}$  los cuales dan idea de la potencia funcional del inhibidor, la constante  $K_i$  refleja la afinidad de unión entre el inhibidor y la enzima. Cuanto menor sea el  $K_i$ , mayor será la afinidad de unión y menor será la cantidad del compuesto necesaria para inhibir la actividad de la enzima [124]. La información referida a los resultados de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ , los test de estadísticos, así como las constantes de inhibición  $K_i$ , se muestra en la Tabla 18.

**TABLA 18.** Tipo de inhibición y parámetros cinéticos enzimáticos obtenidos para AChE y BChE en presencia y ausencia de los análogos.

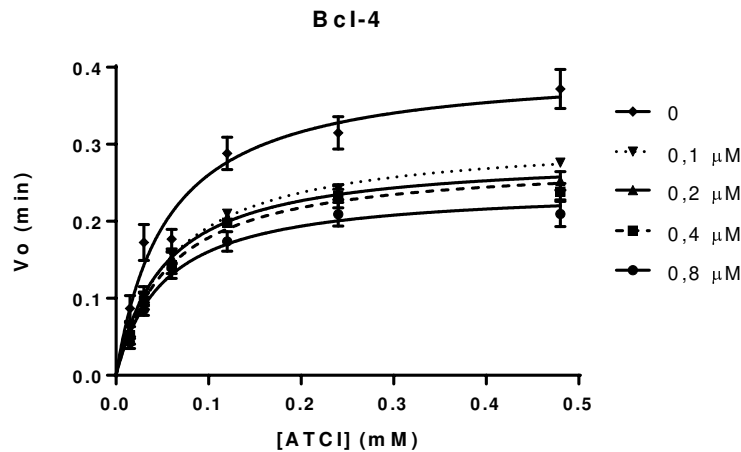
<b>AChE</b>									
<b>Péptido</b>	<b>Vmax<sup>(a)</sup></b>		<b>Km<sup>(a)</sup></b>		<b>Tipo de Inhibición<sup>(c)</sup></b>	<b>Ki (µM)</b>			
	Concentración (µM)	Inhibidor	Basal	P valor <sup>(b)</sup>			Inhibidor	Basal	P valor <sup>(b)</sup>
BcI-4	0,8	0,244 ± 0,0103	0,402 ± 0,022	0,0000	0,052 ± 0,007	0,054 ± 0,022	0,4330	No Competitiva	1,388 ± 0,18
	0,4	0,278 ± 0,009		0,0000	0,056 ± 0,006		0,9719	No Competitiva	
	0,2	0,288 ± 0,006		0,0001	0,053 ± 0,004		0,3812	No Competitiva	
	0,1	0,298 ± 0,003		0,0001	0,056 ± 0,002		0,8417	No Competitiva	
<b>BChE</b>									
BCI- 5	1,6	0,217 ± 0,012	0,347 ± 0,014	0,0003	0,023 ± 0,009	0,038 ± 0,005	0,0822	No Competitiva	2,979 ± 0,35
	0,8	0,261 ± 0,006		0,0007	0,030 ± 0,003		0,1163	No Competitiva	
	0,4	0,268 ± 0,010		0,0013	0,024 ± 0,009		0,0927	No Competitiva	
	0,2	0,290 ± 0,012		0,0061	0,028 ± 0,005		0,0896	No Competitiva	
BcI-13	50	0,213 ± 0,011	0,347 ± 0,014	0,0002	0,048 ± 0,008	0,038 ± 0,005	0,1641	No Competitiva	76,52 ± 7,74
	25	0,229 ± 0,008		0,0002	0,025 ± 0,006		0,067	No Competitiva	
	12,5	0,248 ± 0,008		0,0004	0,029 ± 0,006		0,211	No Competitiva	
	6,25	0,2609 ± 0,0103		0,0010	0,029 ± 0,007		0,172	No Competitiva	
BCI- 14	6,4	0,230 ± 0,007	0,352 ± 0,014	0,0002	0,039 ± 0,002	0,039 ± 0,020	0,9454	No Competitiva	21,12 ± 3,10
	3,2	0,237 ± 0,009		0,0003	0,019 ± 0,003		0,1591	No Competitiva	
	1,6	0,243 ± 0,008		0,0003	0,016 ± 0,002		0,1112	No Competitiva	
	0,8	0,276 ± 0,007		0,0011	0,019 ± 0,002		0,1468	No Competitiva	

<sup>(a)</sup> Los parámetros Vmax y Km fueron determinados utilizando curvas de Michaelis-Menten y expresados con una confianza del 95 %. <sup>(b)</sup> El P valor fue obtenido mediante un test de ANOVA de una vía, (P< 0,05) valores significativamente diferentes, (P> 0,05) valores significativamente no diferentes. <sup>(c)</sup> Tipo de inhibición calculada mediante el análisis del P valor entre Vmax y Km en presencia y ausencia de inhibidor. Inhibición no competitiva: diferentes valores de Vmax e iguales de Km.



El péptido BcI-4 ensayado frente a la AChE, mostró una notable disminución en la  $V_{max}$  de la enzima, incluso una concentración de  $0,1 \mu\text{M}$  (Figura 68). Este hecho demuestra el potencial de actividad de dicho péptido como inhibidor de esta enzima.

Del análisis estadístico comparativo mediante el test de ANOVA de los parámetros cinéticos de  $V_{max}$  y  $K_m$  de la enzima en condiciones basales y en presencia de BcI-4 se pudo observar que, para  $V_{max}$  los valores resultaron significativamente diferentes ( $P$  valor  $< 0,05$ ); mientras que, para  $K_m$  los valores no fueron significativamente diferentes ( $P$  valor  $> 0,05$ ) (ver Tabla 18). Este tipo de comportamiento sugiere que el péptido BcI-4 actúa como un inhibidor de la AChE de tipo no competitivo. Por otro lado, se determinó que posee una constante de inhibición ( $K_i$ ) =  $1,38 \pm 0,18 \mu\text{M}$  (ver Tabla 18).

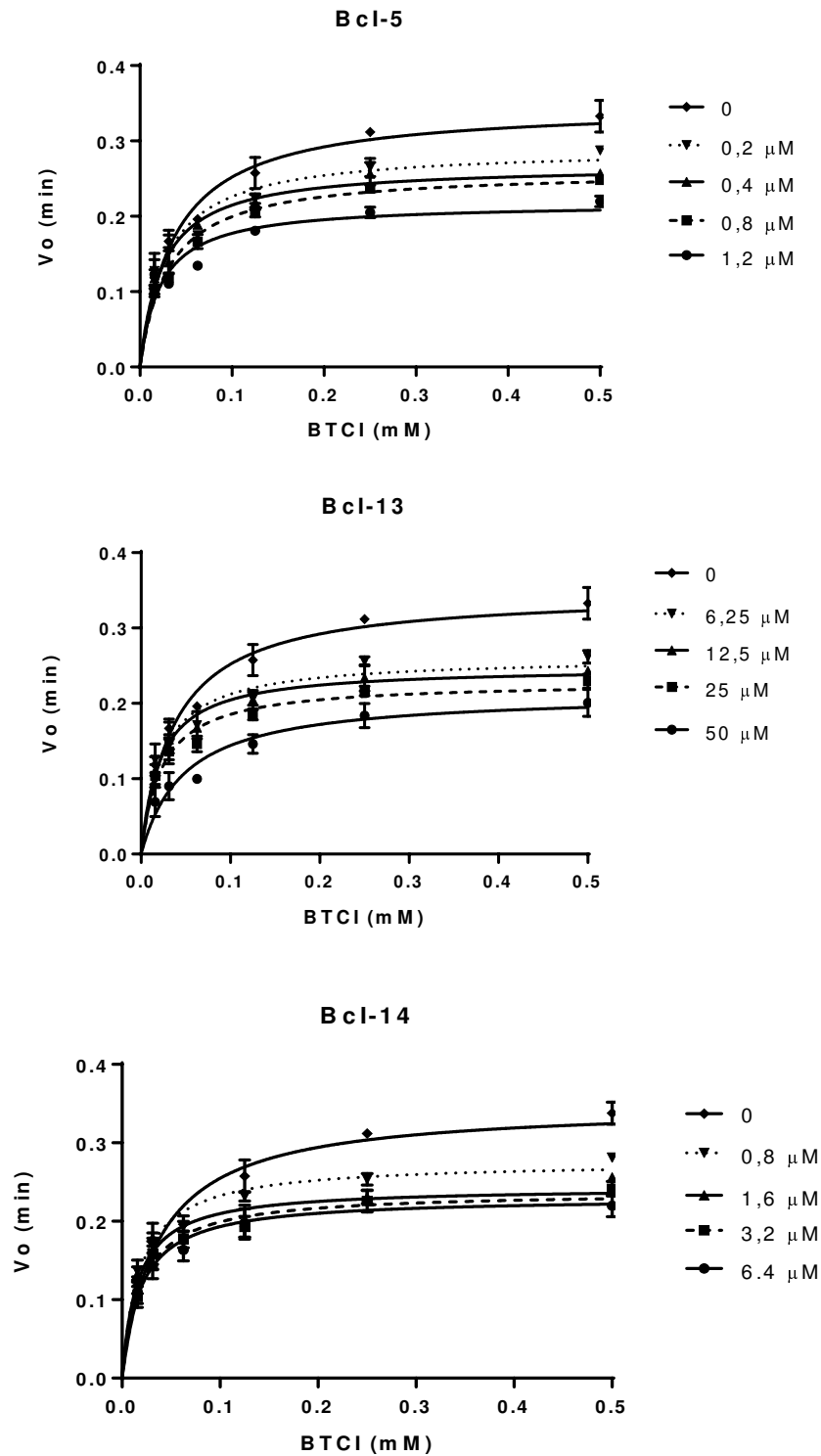


**FIGURA 68.** Curva de Michaelis-Menten para el péptido BcI-4 frente a la AChE, realizada con el software GraphPad Prism 7.

La Figura 69 muestra las curvas de Michaelis-Menten de los análogos BcI-5, BcI-13, y BcI-14 para la BChE. El péptido BcI-5 mostró la capacidad de disminuir la  $V_{max}$  de la enzima en todas las concentraciones ensayadas, inclusive a  $0,2 \mu\text{M}$  (ver Figura 69), poniendo de manifiesto su elevado potencial de inhibición frente a la BChE.

El test de ANOVA, mostró que los parámetros de  $V_{max}$  de la BChE en presencia y ausencia del inhibidor BcI-5 fueron significativamente diferentes ( $P$  valor  $< 0,05$ ); mientras que el valor de  $K_m$  se mantuvo constante estadísticamente ( $P$  valor  $> 0,05$ ). Estos resultados permiten evidenciar que el análogo BcI-5 inhibe a la BChE de modo no competitivo (ver Tabla 18). El valor de  $K_i$  para el péptido BcI-5 fue de  $2,979 \pm 0,35 \mu\text{M}$ .

En lo que respecta a los péptidos BcI-13 y BcI-14, ambos análogos también mostraron un tipo de inhibición no competitiva, disminuyendo significativamente la  $V_{max}$  de la enzima y manteniendo estadísticamente constante su  $K_m$  (ver Tabla 18). Los valores de las  $K_i$  fueron de  $76,52 \pm 7,74$  para BcI-13 y  $21,12 \pm 3,10 \mu M$  para BcI-14.



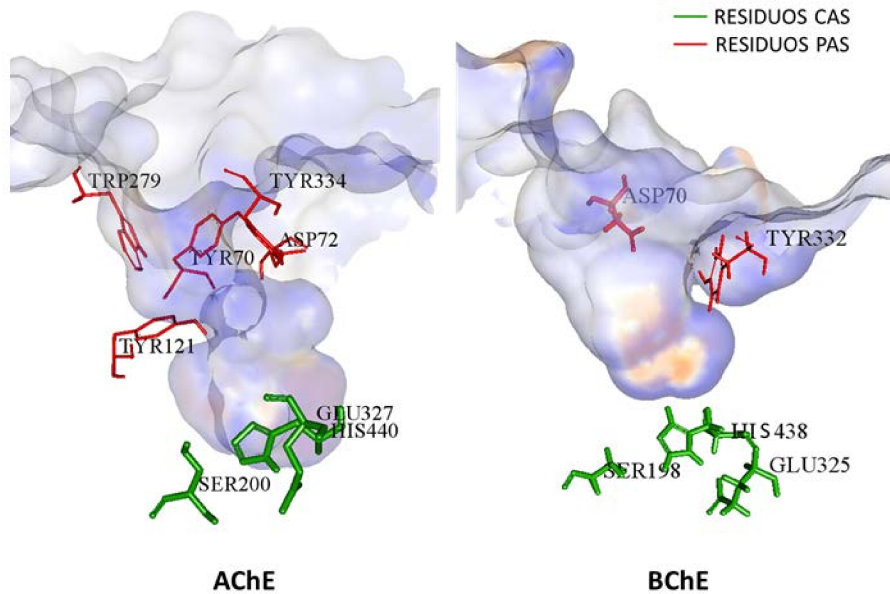
**FIGURA 69.** Curva de Michaelis-Menten para los péptidos BcI-4, BcI-13 y BcI-14 frente a la AChE, realizadas con el software GraphPad Prism 7.

Los cuatro análogos evaluados demostraron actuar a través de un tipo de inhibición no competitiva tanto frente a la AChE como a la BChE. A diferencia de los inhibidores competitivos, los no competitivos no impiden la unión del sustrato a la enzima, de hecho, el inhibidor y el sustrato no afectan la unión del otro con la enzima. Sin embargo, cuando el inhibidor se une, la enzima no puede catalizar su reacción para producir el producto. De esta forma, la inhibición no competitiva actúa reduciendo el número de moléculas funcionales de enzima que pueden realizar la catálisis [332]. Es por esto que, con un inhibidor no competitivo la reacción nunca puede alcanzar su  $V_{max}$ , hecho que puede ser observado en las curvas de Michaelis-Menten para los análogos estudiados (ver Figuras 68 y 69).

Mohan & Gupta han realizado exhaustivas investigaciones sobre las colinesterasas, y en sus estudios han descrito que los inhibidores de tipo competitivo actúan impidiendo el ingreso del sustrato interactuando con el sitio activo (CAS) tanto de la AChE como de la BChE; mientras que los inhibidores no competitivos intervienen principalmente mediante la unión con el sitio PAS de estas enzimas [177].

Los sitios intervinientes en la catálisis enzimática de las colinesterasas se encuentran en el fondo de una “garganta” o *gorge* profundo rico en aminoácidos aromáticos conservados [88]. El sitio PAS se encuentra en la entrada del *gorge*, y tiene la función de posicionar correctamente al sustrato para su interacción con el sitio activo catalítico [83; 89]. En la Figura 70 se esquematiza la zona del *gorge* para ambas colinesterasas. En esta, se observa cómo los residuos del sitio PAS (en rojo) se posicionan en la entrada del *gorge*, mientras que los residuos del sitio CAS (en verde) se hallan hacia el centro de las enzimas.

Como ya se mencionó, el PAS está directamente implicado en la estimulación de la formación y agregación del péptido  $\beta$ -amiloide, produciendo un aumento de la neurotoxicidad de las fibrillas amiloides de las placas seniles cerebrales [89]. Carvajal e Inestrosa han descrito cómo a través del sitio PAS la AChE actúa como chaperona en el proceso de agregación del péptido  $\beta$ -amiloide [78]. Este hecho hace al sitio PAS uno de los blancos de mayor relevancia en la búsqueda de fármacos para la EA.



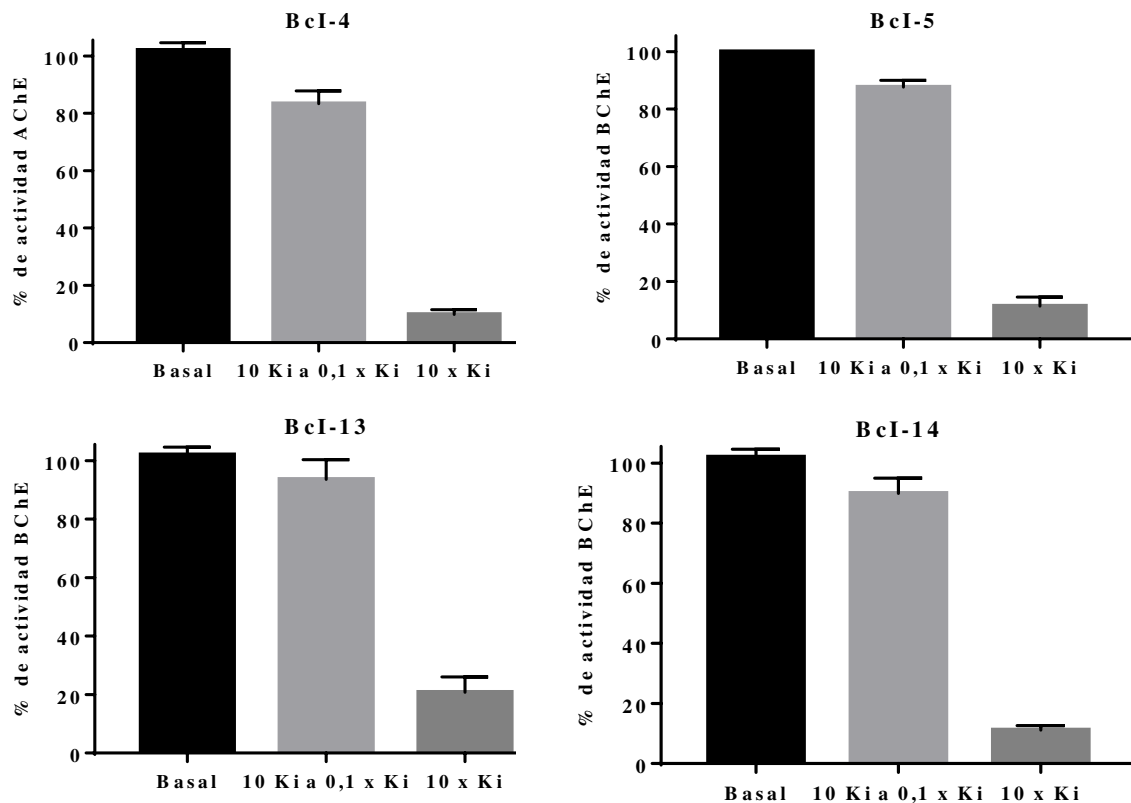
**FIGURA 70.** Representación de la zona del *gorge* para ambas colinesterasas. Residuos del sitio PAS se muestran en rojo, y los residuos del sitio CAS en verde. Imagen realizada mediante el software Discovery StudioVisualizaer (Biovia).

La inhibición de tipo no competitiva de las colinesterasas a través de la interacción con su sitio PAS, ha sido demostrada en diversas investigaciones. Por ejemplo, mediante el análisis de cristalografía de rayos X, se observó que el péptido *Fasciculina-2 (FAS-2)*, potente inhibidor no competitivo de las colinesterasas, estructuralmente está formado por una serie de *loops* que interactúan fuertemente con el sitio PAS de la AChE. Uno de sus *loops* se une a los residuos Try121 y Tyr334, mientras que el otro interacciona con el Trp279. La gran potencia de inhibición de la *FAS-2* radica en que imposibilita el ingreso del sustrato al sitio activo bloqueando el *gorge* al unirse al sitio PAS [89]. Otro ejemplo de esto, es el péptido *Hp-1935*, el cual también posee una potente inhibición del tipo no competitiva para la AChE. Este demostró unirse con el Trp279 del sitio PAS a través de una interacción del tipo alquil-aromática con una Lys de su secuencia [43]. El péptido *Hp-1971*, aislado junto a *Hp-1935*, también mostro ser un inhibidor no competitivo, pero en este caso de la BChE, interactuando con el Tyr332 del sitio PAS de dicha enzima [61]. Ambos péptidos mostraron, mediante análisis de dinámica molecular, que su interacción con el sitio PAS bloqueaba el ingreso del sustrato al sitio catalítico de la enzima [43; 61]. De esta manera, resulta muy alentador que los péptidos BcI-4, BcI-5 BcI-13 y BcI-14 demuestren ser potentes inhibidores de la AChE y la BChE de modo no competitivo.

## Ensayos de reversibilidad de los análogos frente a la AChE y BChE

A modo de complementar los estudios cinéticos, se evaluó la reversibilidad de la inhibición de los análogos frente a las colinesterasas. Esto fue llevado a cabo mediante la evaluación de la recuperación de la actividad enzimática luego de realizar una dilución del complejo enzima-inhibidor.

Mediante este tipo de metodología se puede conocer si el complejo enzima-inhibidor es capaz de disociarse, a través de un salto en su dilución. Esto consiste en obtener primeramente un complejo enzima-inhibidor en condiciones de saturación, con la enzima completamente inhibida, para luego diluir rápidamente el complejo y permitir recuperar la actividad enzimática. La AChE y la BChE fueron pre-incubadas con los análogos a concentraciones de 10 x Ki, las cuales fueron posteriormente diluidas 100 veces con solución cromógeno-sustrato, alcanzando concentraciones finales de 0,1 x Ki. Este tipo de ensayos para ser válido requiere de controles que evalúen la actividad basal de la enzima sin inhibidor, y un control de 10 x Ki que permita comprobar la estabilidad en la inhibición del complejo enzima-inhibidor [333].



**FIGURA 71.** Gráficas de recuperación de la actividad enzimática porcentual para las enzimas AChE y BChE frente a los análogos sintéticos. 10 Ki a 0,1 x Ki: concentración final del péptido a 10 x Ki luego de la dilución 1/100 con solución cromógeno-sustrato. Basal: actividad enzimática sin inhibidor. 10 x Ki: control de inhibición enzimática a una concentración de 10 x Ki del análogo. Los gráficos representan el porcentaje de actividad enzimática luego de 5 min de realizada la dilución.

Los resultados de los ensayos de reversibilidad de los análogos se muestran en la Figura 71. Al igual que los estudios de cinética, el análogo BcI-4 fue evaluado frente a la AChE, mientras que BcI-5, BcI-13 y BcI-14 frente a BChE. Los porcentajes de recuperación de la actividad enzimática fue determinado frente a la actividad basal (en ausencia de análogos).

Los cuatro análogos evaluados lograron recuperar la actividad enzimática luego de la dilución, mostrando actuar de manera reversible. Los resultados para BcI-4 muestran que luego de la dilución de 10 a 0,1 x Ki, la actividad de la AChE es recuperada en un 86 % respecto a la actividad del basal.

En relación a los análogos que inhiben la BChE, se observó que la actividad de esta enzima es recuperada al 90 % luego de diluir de 10 a 0,1 x Ki al complejo BChE/BcI-5. En lo que respecta a BcI-13 y BcI-14, ambos mostraron una recuperación superior al 95 % de la actividad catalítica de la BChE, luego de la dilución de los complejos enzima inhibidor.

En todos los casos los controles de inhibición del complejo enzima inhibidor a concentraciones de 10 x Ki se mantuvieron estables durante el período del ensayo.

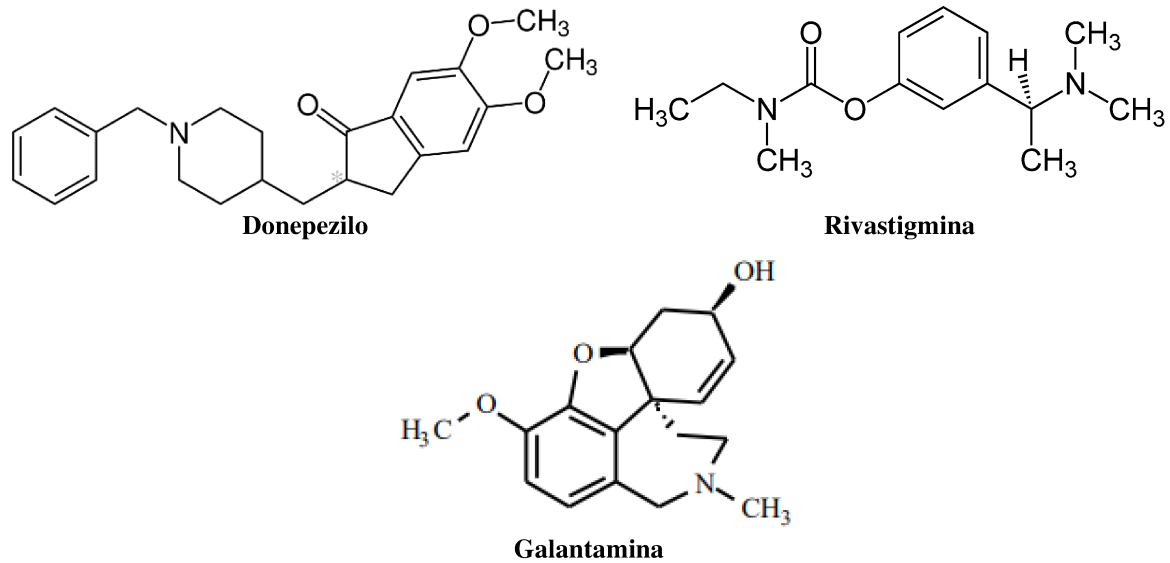
Estos resultados, junto a los obtenidos mediante el estudio de las cinéticas de inhibición, permiten evidenciar que los análogos BcI-4, BcI-5, BcI-13 y BcI-14 actúan inhibiendo a las colinesterasas de manera reversible no competitiva.

En lo que respecta al diseño de fármacos para la EA, se busca que los inhibidores de las colinesterasas actúen de modo reversible, a fin de poder realizar una adecuada modulación de la actividad enzimática, y luego disociarse. De lo contrario, al utilizar inhibidores de tipo irreversible se produciría una pérdida total de la funcionalidad normal de las enzimas [125]. Hasta el momento la EA no posee cura, pero mediante la utilización de inhibidores reversibles de las colinesterasas como terapias, se ha logrado mejorar la sintomatología de manera paliativa [125]. Los análogos estudiados mostraron la capacidad de actuar de modo reversible frente a las colinesterasas.

### Comparación de la actividad de los análogos con fármacos comerciales

Actualmente, de los cinco fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA, tres corresponden a inhibidores de las colinesterasas: la Galantamina, el

Donepezilo, y la Rivastigmina (Figura 72) [90]. Estos difieren entre sí en sus propiedades farmacológicas.



**FIGURA 72.** Estructura química de los inhibidores de colinesterasas Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina para el tratamiento de la EA aprobados por la FDA. Representación realizada con ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

El Donepezilo, aprobado en 1996; es un compuesto derivado de la piperidina, el cual actúa como inhibidor reversible no competitivo y de corta acción. Aunque inhibe fundamentalmente la AChE, también presenta acción inhibitoria frente a la BChE [334-335]. Se ha demostrado que la inhibición del Donepezilo se da a través de la interacción con el sitio CAS y PAS de la AChE, por lo cual presenta un tipo de inhibición mixta (competitiva y no competitiva) [336-337].

Por su parte, la Rivastigmina, aprobada en el 2000, es un inhibidor semisintético derivado de la fisostigmina. Su inhibición es dual, tanto de AChE como de BChE. Este fármaco es capaz de formar un complejo carbamilo con la serina del CAS, por lo cual, es descrito como un inhibidor pseudoirreversible debido a su alta duración en la interacción con las colinesterasas, inactivándose durante 8,5 (para la AChE) y 3,5 horas (para la BChE) [338-339]

La Galantamina, aprobada en el año 2001, es un alcaloide aislado de la planta *Galanthus woronowii*, que actúa como inhibidor de tipo reversible competitivo, que si bien su principal blanco es la AChE también posee inhibición frente a la BChE [340-341].

Un análisis comparativo de las actividades inhibitorias y los mecanismos de acción entre los fármacos inhibidores de las colinesterasas aprobados por la FDA y los análogos más activos aquí estudiados se muestra en la Tabla 19.

**TABLA 19.** Información sobre la inhibición de las colinesterasas por parte de los fármacos aprobados por la FDA y los análogos peptídicos más activos

Compuesto <sup>(a)</sup>	IC50 (µM)		Tipo de Inhibición	Reversibilidad
	AChE	BChE		
Galantamina (Alcaloide)	0,80 ± 0,06 <sup>[342]</sup>	6,60 ± 0,00 <sup>[342]</sup>	Competitiva	Reversible
Donepezilo (Piperidina)	0,02 ± 0,00 <sup>[343]</sup>	7,42 ± 0,40 <sup>[343]</sup>	Mixta	Rápidamente reversible
Rivastigmina (Carbamato)	34,17 ± 6,00	0,08 ± 0	Competitiva	Pseudoirreversible
BcI-4 (Péptido)	0,90 ± 0,40	NI	No competitiva	Reversible
BcI-5 (Péptido)	NI	0,82 ± 0,05	No competitiva	Reversible
BcI-13 (Péptido)	NI	14,42 ± 1,00	No competitiva	Reversible
BcI-14 (Péptido)	NI	2,12 ± 0,00	No competitiva	Reversible

<sup>(a)</sup> La naturaleza química del compuesto se denota entre paréntesis.

Los análogos peptídicos estudiados en la presente tesis presentaron una notable inhibición de las colinesterasas alcanzando, e incluso superando, los valores de inhibición los fármacos comerciales. Para la AChE, se pudo observar que el análogo BcI-4 presentó una actividad inhibitoria superior a la Rivastigmina. Alcanzando el 50 % de inhibición de la AChE a una concentración de 0,90 µM, mientras que la Rivastigmina lo alcanza a 4,15 µM, una concentración cuatro veces superior. Además, BcI-4 posee una potencia de inhibición igual a la de la Galantamina. De la comparación con el Donepezilo, que al igual que BcI-4, presenta inhibición del tipo no competitiva para AChE, se observa que este último posee una potencia de inhibición menor en un orden de magnitud. Si bien el Donepezilo resulta más activo, la cercanía en sus valores de inhibición hace que BcI-4 sea altamente prometedor, ya que este es un análogo con potencialidad para optimizar su secuencia y lograr mayor actividad.

En cuanto a BChE, los análogos BcI-5 y BcI-14, presentaron una importante capacidad inhibitoria, con valores IC50 que superan notablemente a tanto a la actividad de la Galantamina como la del Donepezilo frente a esta enzima. BcI-5 alcanzó los valores de inhibición de la Galantamina y el Donepezilo a una concentración seis y siete veces



menor. Por su parte, BcI-14 igualó la inhibición de mencionados fármacos a concentraciones entre ocho y nueve veces menor.

Una de las características más importantes a la hora de la selección de candidatos a líderes farmacológicos en etapas de investigación preclínicas, es la potencia de estos. Es decir que aquellos compuestos que logren alcanzar la actividad deseada a una menor dosis, o concentración, serán más prometedores para avanzar en las etapas posteriores de estudio [344]. En lo que respecta a las investigaciones en inhibidores enzimáticos, se tiene como criterio que valores de IC<sub>50</sub> del orden de 1  $\mu$ M son considerados prometedores, y muy prometedores a partir de 1 nM; por otro lado, valores que superen estos ordenes (1  $\mu$ M) son catalogados como de baja actividad y la relación/ costo beneficio para la generación de nuevos fármacos no sería óptima. Para el caso de los análogos BcI-4 y BcI-5, estos primeros valores de inhibición alcanzados resultan sumamente prometedores.

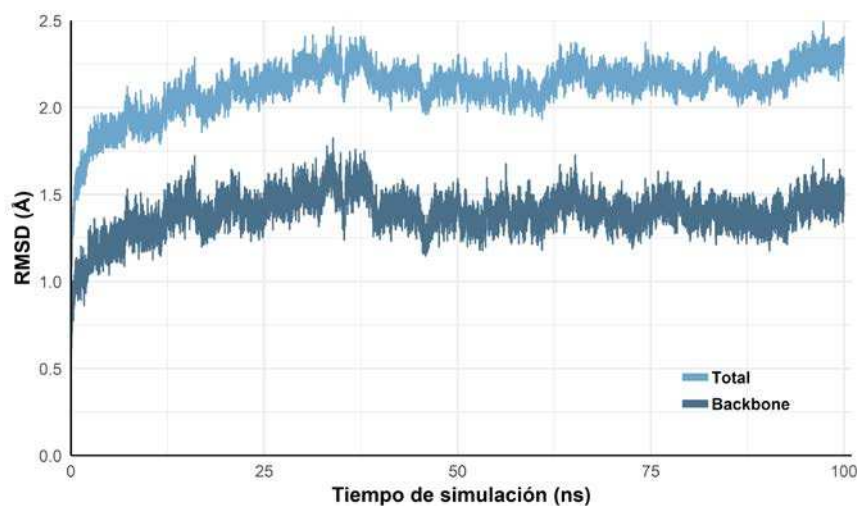
### Estudios computacionales de frente a las colinesterasas

A modo de profundizar en el análisis sobre el mecanismo de inhibición de los análogos BcI-4 y BcI-5 frente a la AChE y BChE, respectivamente, se utilizaron herramientas computacionales. Las herramientas computacionales son útiles para adquirir conocimiento acerca de la interacción entre la proteína-ligando, brindando información sobre los residuos que se encuentran involucrados en la inhibición.

#### Interacción BcI-4/AChE

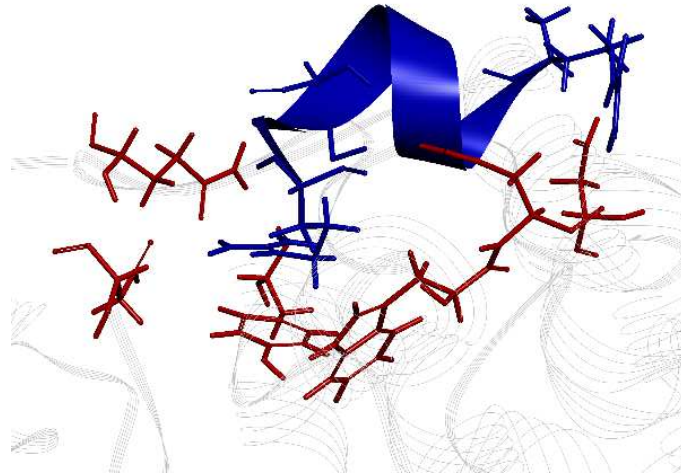
Inicialmente se realizó un estudio de *docking* utilizando el servidor HADDOCK. Este incluye una función de *score* que asigna un *Z-score* a los grupos o *clusters* de las configuraciones encontradas, indicando a cuantas desviaciones estándar del promedio de los *clusters* se encuentra el modelo, cuanto más negativo es el *Z-score* mejor es el modelo. En el caso del *docking* del péptido BcI-4 frente a AChE el *Cluster* 3 fue el de mejor puntaje, con un *Z-score* de  $-79.5 \pm 3.0$ . Las mejores conformaciones de cada *cluster* se utilizaron como estructuras de base para comenzar con los estudios de dinámica molecular. Como se mencionó anteriormente, esta metodología es la más adecuada para la evaluación de la interacción proteína-ligando ya que predice, a diferencia del *docking*, la evolución dependiente del tiempo [345]. Por lo cual se simuló mediante dinámica molecular el comportamiento de los complejos BcI-4/AChE obtenidos con el *docking* en solvente explícito durante 100 ns.

Posteriormente se evaluó la estabilidad del sistema a lo largo de la simulación con el parámetro RMSD. El mismo es una medida de la estabilidad estructural que calcula la distancia promedio entre los átomos de una estructura en un período de tiempo. Cuando se corre una simulación de dinámica molecular el sistema se traslada del origen y va rotando, y para poder hacer un análisis confiable de los resultados deben utilizarse las estructuras provenientes de una región temporal estable dentro de la secuencia. La Figura 73 muestra los resultados del análisis de RMSD para el esqueleto o *backbone* y para el total de los átomos del sistema. Mediante este análisis se observó un aumento en las primeras etapas de la simulación, luego; a partir de los 12,5 ns hubo un cambio estructural seguido de una estabilización que se mantuvo hasta el final de la simulación, observada tanto en el *backbone* como en el total de los átomos del sistema, con valores de RMSD oscilantes entre de 1,5 y 2 Å, respectivamente. Esto indicó que el sistema logró alcanzar un equilibrio estructural dentro de los 100 ns de simulación.



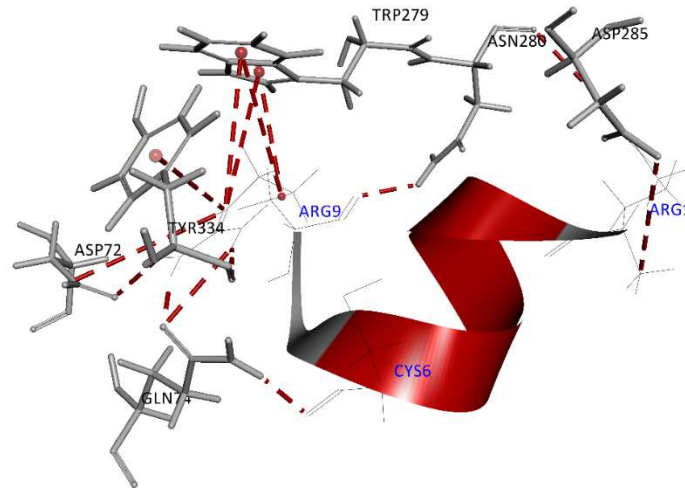
**FIGURA 73.** Grafico del parametro de RMSD *versus* tiempo de simulación para el complejo BcI-4/AChE, para la el *backbone* y el total de los átomos del sistema.

Posteriormente, la obtención de la estructura más representativa entre las generadas durante la simulación, se realizó mediante la aplicación de un algoritmo de *clustering* a las estructuras generadas en los últimos 10 ns de simulación, y se consideró representativa la estructura más cercana al centroide del *cluster* más poblado. La estructura representativa para el péptido BcI-4/AChE es mostrada en la Figura 74. En esta, se puede observar al péptido BcI-4 (azul) interactuando con los residuos de la AChE (rojo), y además bloqueado el ingreso al sitio catalítico de la enzima.

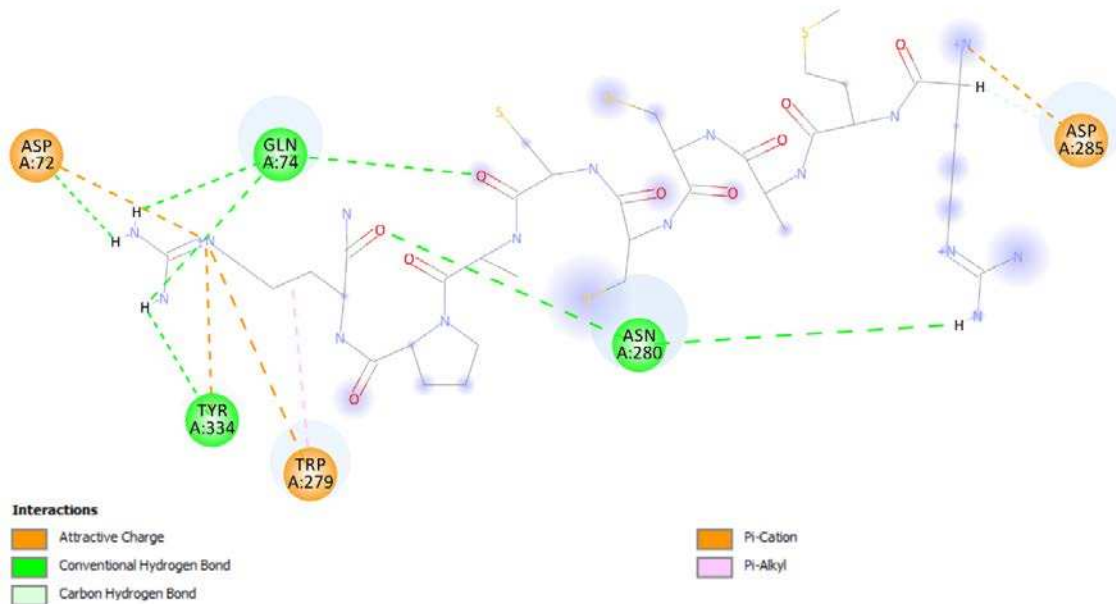


**FIGURA 74.** Representación de la interacción entre el análogo BcI-4 (azul) con residuos de la AChE (rojo). Imagen obtenida a partir del análisis con el software Discovery Studio (Biovia).

Una observación más detallada de la interacción puede observarse en las Figuras 75 y 76, donde se muestra la interacción entre los residuos del ligando y la enzima en 3D y 2D, respectivamente. En estas figuras se puede observar al péptido BcI-4 interactuar con tres de los cinco residuos del sitio PAS de la AChE (Asp72, Trp279 y Trp334). En base a esto, el Asp72 presenta interacción del tipo puente hidrogeno y cargas atractivas con el residuo Arg9. En lo que respecta al Trp279, este interacciona a través de su anillo indólico, formando un enlace de tipo Pi-cación con el nitrógeno secundario de la Arg9, y mediante un enlace de tipo  $\pi$ -alquil con los carbonos 3 y 4 del mismo residuo. Por otro lado, la Try334, uno de los residuos claves del sitio PAS, interacciona mediante su anillo aromático con el nitrógeno secundario de la Arg9, por un enlace de tipo Pi-cación y a través de un enlace de tipo puente hidrógeno entre su oxígeno carboxílico con el protón de una de las aminas primarias de la Arg9. Por otro lado, se puede observar otras interacciones que logran estabilizar la unión entre el ligando y la enzima (Cys6/Gln74, Arg9/Asn280 y Arg1/Asp285).



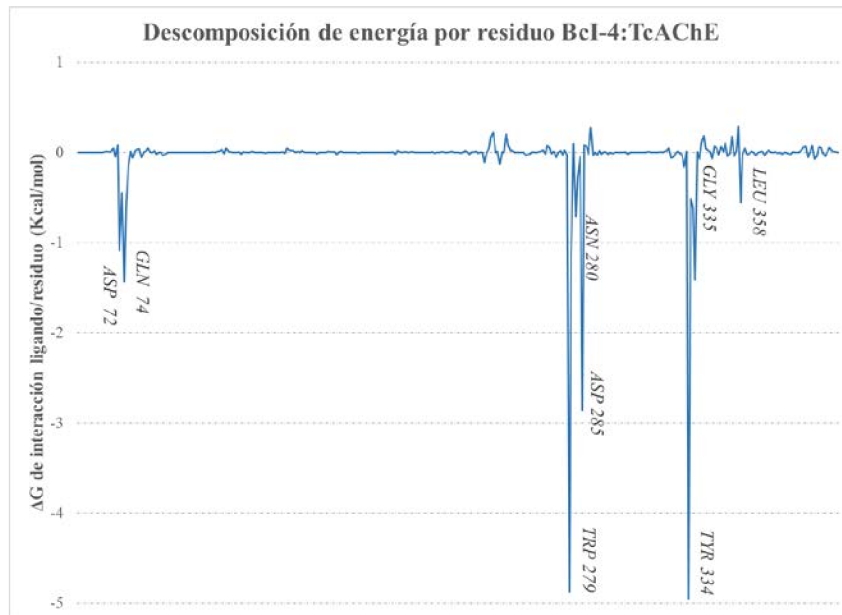
**FIGURA 75.** Visualización de las interacciones (líneas rojas) entre residuos del análogo BcI-4 y residuos de la AChE (gris). Imagen obtenida a partir del análisis con el software Discovery Studio (Biovia).



**FIGURA 76.** Representación 2D de las interacciones entre los residuos de BcI-4 y la AChE. Las líneas entrecortadas representan cada tipo de interacción. Imagen obtenida a partir del análisis con el software Discovery Studio (Biovia).

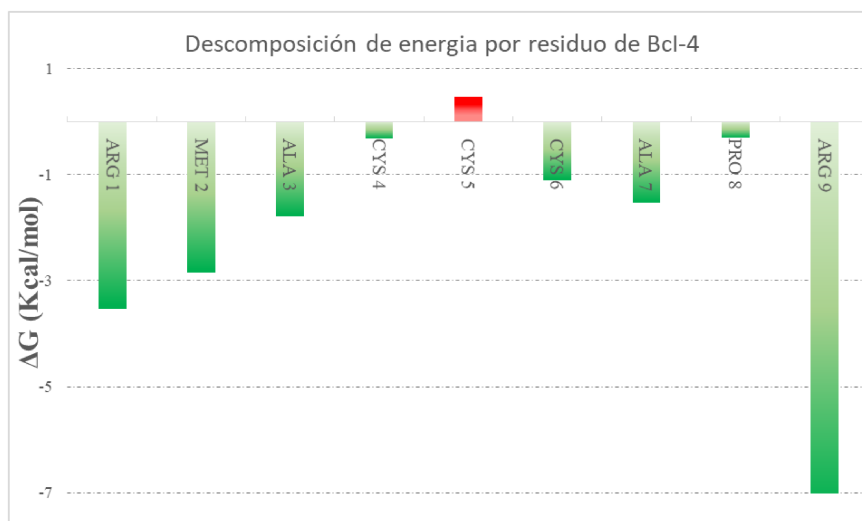
Adicionalmente, y con el objetivo de conocer cuales fueron los residuos de la enzima con los cuales hubo mayor interacción, se realizó un análisis de cálculo de energía de interacción por residuo utilizando método MM-GBSA (Figura 77). Este cálculo se realizó sobre un conjunto de estructuras provenientes de los últimos 10 ns de simulación, por lo que resulta representativo de la interacción promedio de cada residuo con la enzima durante el lapso de tiempo y, potencialmente, aporta información confiable sobre la importancia de cada residuo. Se pudo observar que los residuos de la AChE que más

fuertemente interactuaron con BcI-4 son la Try334, el Trp279 y la Asp285, con  $\Delta G$  de -4,95, -4,88 y -2,86 Kcal/mol, respectivamente.



**FIGURA 77.** Energía de interacción entre el análogo BcI-4 y los residuos de AChE. Los datos expresan el  $\Delta G$  total calculado con el método MM-GBSA. Aquellos residuos con mayor energía de interacción son indicados.

El mismo análisis de descomposición por residuo se realizó para los residuos del péptido BcI-4 (Figura 78). Los resultados mostraron que la mayor contribución al enlace con AChE esta dada por la Arg9 con un  $\Delta G$  de -7,54 Kcal/mol, seguida por la Arg1 con un  $\Delta G$  de -3,52 Kcal/mol. Además, se observó que la Cys5 no favorece la interacción con un  $\Delta G$  positivo de 0,47 Kcal/mol.

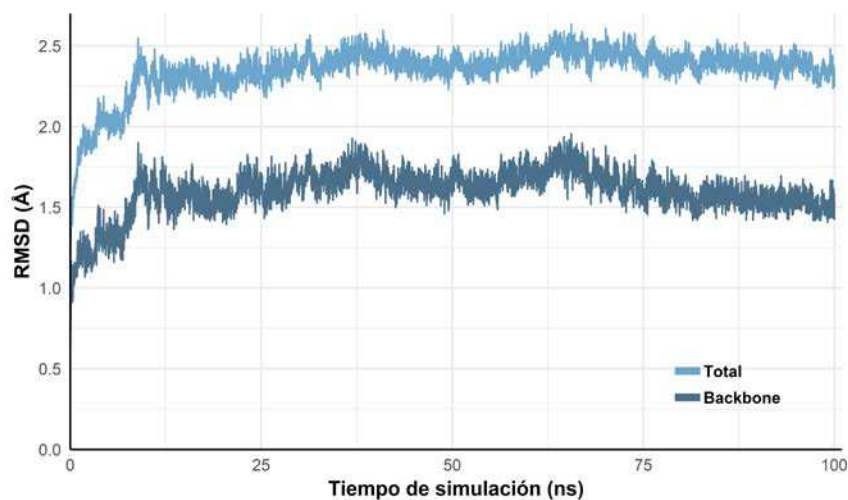


**FIGURA 78.** Energía de interacción de los residuos del análogo BcI-4 y la AChE. Los datos expresan el  $\Delta G$  total calculado con el método MM-GBSA. Menor energía representa una mayor fuerza de interacción.

A modo de resumen de este análisis de dinámica molecular para el complejo BcI4/AChE, se pudo observar que el péptido interactúa principalmente con residuos del sitio PAS. Siendo las interacciones entre la Tyr334 y el Trp279 con la Arg9 las que más contribuyen al enlace. Reportes previos han demostrado que los residuos con los que interactúa BcI-4, son también los que interactúan con varios inhibidores de gran portencia. El péptido *Fas-2* lleva a cabo su inhibición principalmente mediante la interacción con los residuos Try121, Trp279y Tyr334, de la TcAChE [346]. Por otro lado, el fármaco Donepezilo, interactúa a través del residuo Trp279 mediante una fuerte interacción de tipo  $\pi$ - $\pi$  [347].

### Interacción BcI-5/BChE

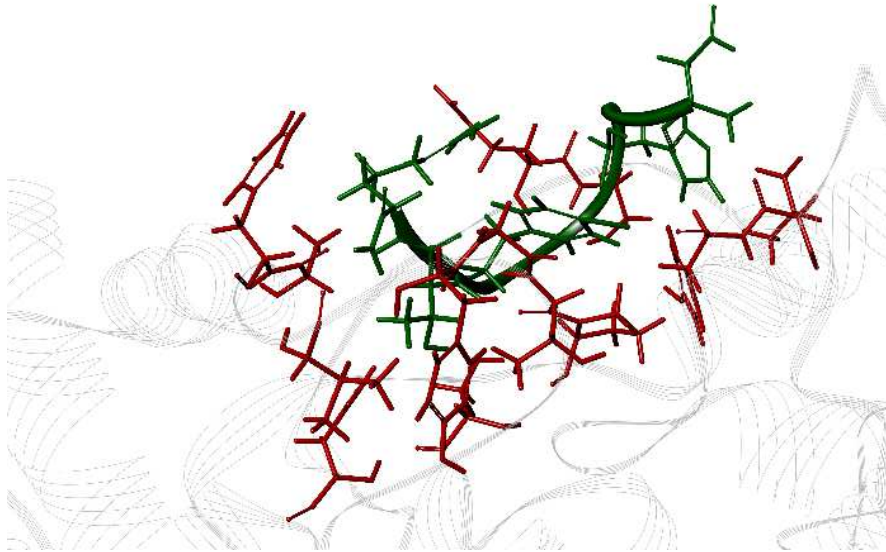
Por otro lado, se estudió la interacción entre el péptido BcI-5 y la BChE. Para ello se procedió de igual modo que lo realizado para el caso anterior. El *cluster* de *docking* mejor puntuado identificado por el HADDOCK presentó un valor de *Z-score* de  $-84,1 \pm 1,8$ . Las mejores estructuras dentro de éste *cluster* se utilizaron para la dinámica molecular. En la Figura 79 se muestra el resultado del análisis de RMSD, del cual se observó que tanto los átomos del *backbone* como el total de los átomos alcanzaron la estabilidad durante la simulación con valores de RMSD entorno a los 1,5 y 2,5 Å, respectivamente.



**FIGURA 79.** Grafico del parametro de RMSD *versus* tiempo de simulación para el complejo BcI-5/BChE, para la *backbone* y el total de los atomos del sistema.

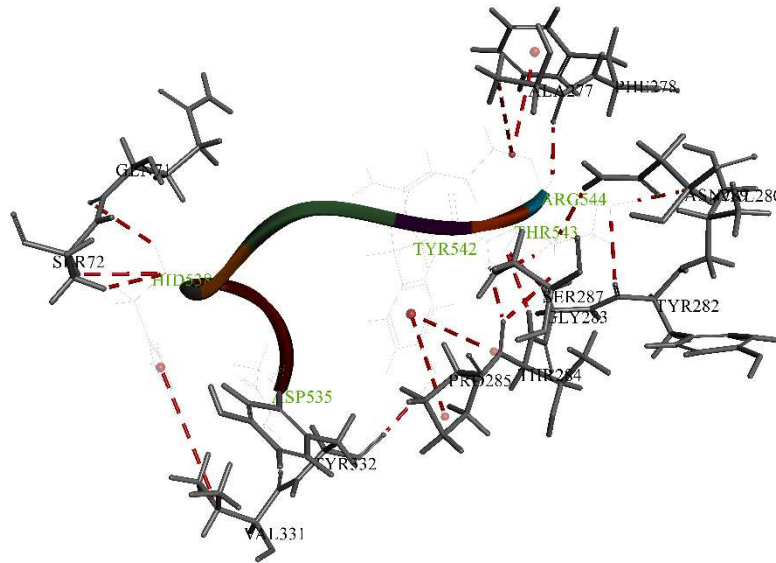
Se seleccionó una estructura representativa mediante el algoritmo de *clustering*. En la Figura 80 se muestra la interacción de BcI-5/BChE. Se puede observar que el

péptido (verde) se posiciona sobre la superficie de la enzima interactuando con múltiples residuos de la BChE (rojo).

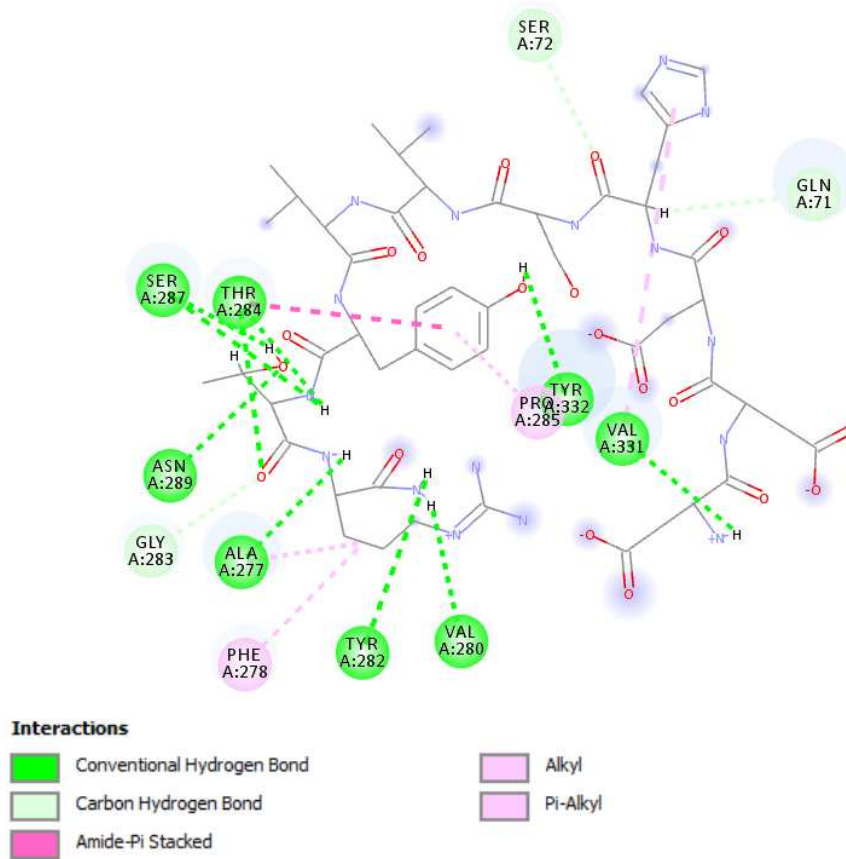


**FIGURA 80.** Representación de la interacción entre el análogo BcI-5 (verde) con residuos de la BChE (rojo). Imagen obtenida a partir del análisis con el software Discovery Studio (Biovia).

El análisis de las interacciones 3D y 2D se muestran en las Figuras 81 y 82. En ellas se puede observar que, los extremos N-terminal y amida-terminal del péptido son los que principalmente participan de la interacción, siendo el extremo amida-terminal el que mayor número de interacciones presenta. Se puede ver que la Tyr8 de BcI-5 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno fenólico de la Try332, que forma parte del sitio PAS de la BChE. Además, la Arg10 interactúa mediante un puente de hidrógeno y enlace alquilo con la Ala277, que algunos autores la han catalogado como parte del sitio PAS [86]. A estas interacciones se le suma el hecho que el péptido está notablemente enlazado mediante puentes de hidrógeno con otros residuos que forman parte de *gorge* a la entrada del sitio catalítico (Gln71, Ser72, Val280, Tyr282, Gly283 y Thr284) [86].



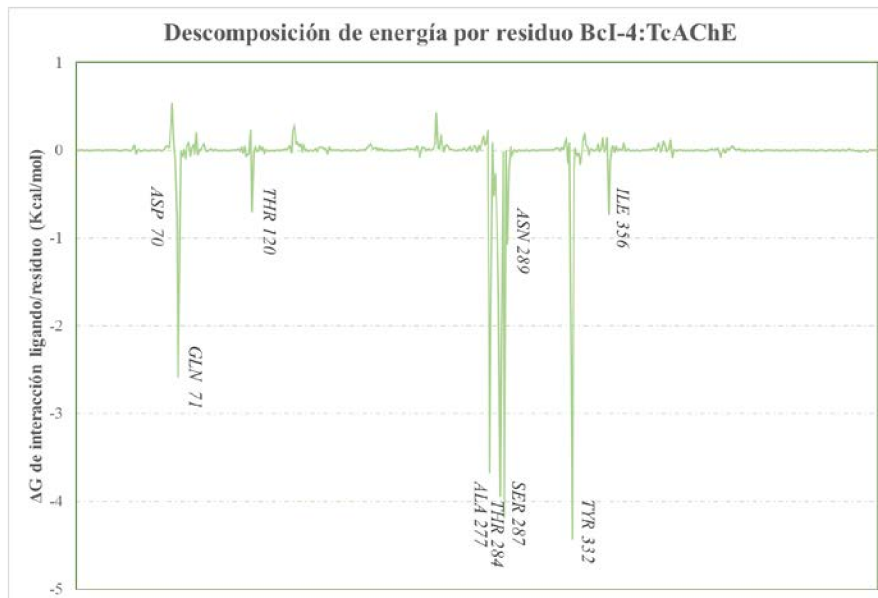
**FIGURA 81.** Visualización de las interacciones (líneas rojas) entre residuos del análogo BcI-5 y residuos de la BChE (gris). Imagen obtenida a partir del análisis con el software Discovery Studio (Biovia).



**FIGURA 82.** Representación 2D de las interacciones entre los residuos de BcI-5 y la BChE. Las líneas entrecortadas representan cada tipo de interacción. Imagen obtenida a partir del análisis con el software Discovery Studio (Biovia).

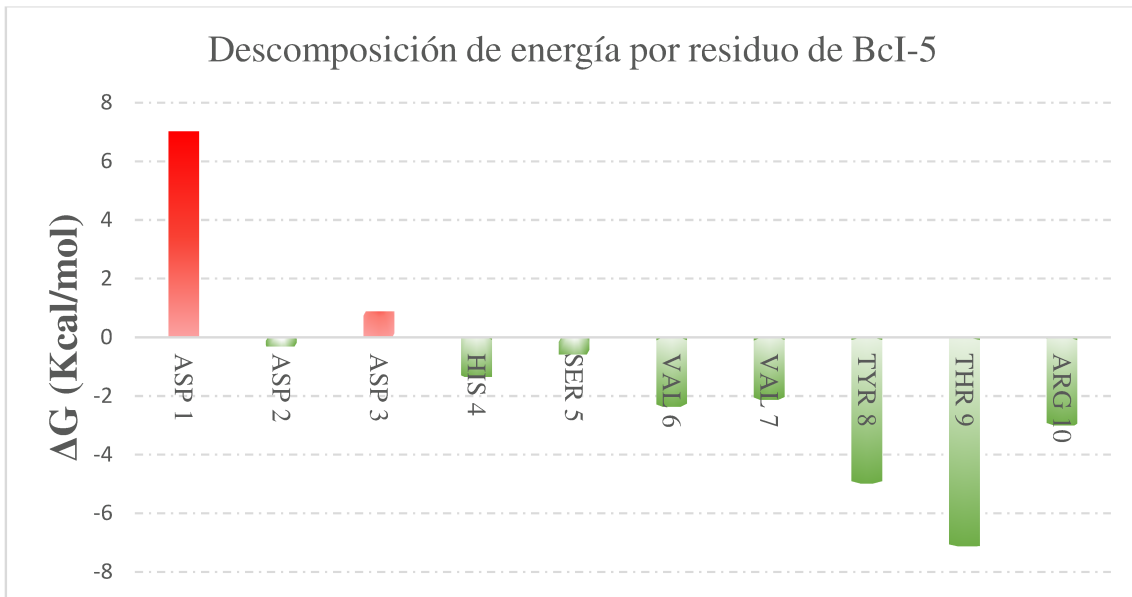


El análisis MM-GBSA de descomposición de energía por residuos muestra que la interacción de los residuos Tyr332, Ser287, Thr284, Ala277 y Gln71 de la BChE predominan en la interacción global con el péptido BcI-5, con valores de  $\Delta G$  de -4,43, -4,18, -3,94, -3,67, y -2,57 Kcal/mol, respectivamente (Figura 83). Interesantemente, el residuo Tyr332 del sitio PAS es el que mayor energía de interacción de enlace posee.



**FIGURA 83.** Energía de interacción entre el análogo BcI-5 y los residuos de BChE. Los datos expresan el  $\Delta G$  total calculado con el método MM-GBSA. Aquellos residuos con mayor energía de interacción son indicados.

En lo que respecta al análisis de interacción de los residuos del péptido BcI-5 (Figura 84), se observó que la Thr9 posee una elevada energía de enlace con un valor de  $\Delta G$  de -7,13 Kcal/mol. Esto es debido a que esta interacción se presenta con los residuos Thr284, Ser287, Asn289, y Gly283 de la enzima mediante puente hidrógeno, lograndose una fuerte unión del péptido a la enzima. Por otro lado, la Tyr8 que interacciona con la Tyr332 del sitio PAS posee una energía de enlace de -4,99 Kcal/mol. Por otro lado, se pudo observar que los residuos Asp1 y Asp3, desfavorecen a la interacción enzima-ligando, con  $\Delta G$  positivos.



**FIGURA 84.** Energía de interacción de los residuos del análogo BcI-5 y la BChE. Los datos expresan el  $\Delta G$  total calculado con el método MM-GBSA. Menor energía representa una mayor fuerza de interacción.

Los resultados obtenidos mediante estudios de dinámica molecular para el complejo BcI-5/BChE evidenciaron que este análogo interacciona con el residuo Try332, que forma parte del sitio PAS de la BChE. Y además, que el complejo enzima-ligando esta fuertemente estabilizado por interacciones de puentes de hidrógenos con otros residuos de la enzima. En cuanto a péptidos inhibidores de la BChE reportados, *Hp-1971*, también mostró interactuar con el Tyr332, bloqueando el *gorge*, y evitando así el ingreso del sustrato al sitio activo de la enzima [61].

Los estudios computacionales permitieron adquirir valiosa información sobre los complejos enzima-inhibidor. En cuanto a los análogos BcI-4 y BcI-5 se pudo conocer en profundidad como se lleva a cabo su interacción con la AChE y BChE. Además, se logró evidenciar que las analogos interaccionan con las enzimas correspondientes mediante el sitio PAS. Previamente, los estudios cinéticos para estos análogos mostraron que la inhibición que produce es del tipo no competitiva, hecho que se corrobora con los resultados de dinámica molecular.

### III.4. Los análogos como agentes multimoduladores de las vías patológicas de la EA

Se ha demostrado que la EA es una compleja enfermedad de naturaleza multifactorial, cuya etiología exacta no es conocida totalmente, pero si se han identificados factores como, la actividad colinérgica cerebral reducida, los agregados de

placas A $\beta$ , la agregación de microtúbulos de la proteína  $\tau$ , la sobreexpresión de las MAOs, la neuroinflamación y el estrés oxidativo, y dishomeostasis de biometales, considerados las principales rutas patológicas involucradas en la enfermedad [68-69].

La eficiencia clínica de las terapias actuales para la EA es limitada, ya que la gran complejidad de esta hace que se requiera administrar varios fármacos a los pacientes que la padecen. Es por esto, que en los últimos tiempos las investigaciones en el desarrollo de nuevos fármacos se han enfocado en el desarrollo de terapias de tipo MTDLs. La estrategia de MTDLs consiste en la utilización de una sola molécula capaz de modular múltiples vías patológicas vinculadas, para alterar el curso de la Enfermedad o incluso curarla [184; 348]. Los MTDLs pueden ser de una molécula individual con una múltiple bioactividad, o bien pueden diseñarse a través de la unión de dos farmacóforos, con actividades diferentes, mediante un *linker* para formar un híbrido [184].

Esta estrategia de diseño se ha aplicado con éxito en inhibidores de las colinesterasas, proporcionándoles multifuncionalidad, además de mejorar su actividad. Por ejemplo, un híbrido diseñado de Rivastigmina-Calcona ha logrado aumentar la actividad inhibitoria de la Rivastigmina frente a la AChE, generando una potente molécula dual para ambas colinesterasas [349]. Algo similar fue realizado con la Galantamina, en donde se sintetizaron híbridos de Galantamina y péptidos, los cuales lograron generar actividad inhibitoria frente a BChE, y también incrementar notablemente la inhibición de AChE [350].

En la presente tesis, varios de los péptidos aislados de la piel de la especie *B. cordobae* han demostrado ser capaces de actuar en la modulación de los blancos terapéuticos de la EA. Entre ellos se puede mencionar a los péptidos BcI-4, BcI-7, BcI-8, BcI-13, BcI-14, y BcI-15 con bioactividad a concentraciones no mayores a los 200  $\mu$ M al menos frente a dos de los blancos terapéuticos de la EA.

El péptido BcI-4 por su parte, resultó ser el más prometedor de los péptidos estudiados como candidato a MTDL, presentando una potente actividad moduladora de las enzimas AChE y MAO-B, además de mostrar actividad antioxidante y quelante del ion metálico Fe<sup>2+</sup>. No obstante, el análogo BcI-4 no presenta la capacidad de inhibir la enzima BChE. La BChE representa un blanco fundamental en la teoría colinérgica de la EA, debido a que cuando la función hidrolítica de la AChE es inhibida, la BChE es capaz de suplantar su función manteniendo reducidos los niveles del neurotransmisor

acetilcolina, disminuyendo así la sinapsis colinérgica [82; 164]. El más potente de los análogos estudiados en la inhibición de la BChE fue el péptido BcI-5, con valores de IC50 y Ki de 0,82 y 2,97  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Notablemente, BcI-5 presentó solamente actividad sobre esta enzima y no sobre las demás vías estudiadas. Los valores de inhibición que presenta BcI-5 superan en algunos casos a los inhibidores comerciales de la BChE (Galantamina y Donepezilo). Esto hace que BcI-4 y BcI-5 sean excelentes candidatos para la futura generación de una molécula híbrida con capacidad de MTDL frente a las cinco rutas patológicas mencionadas de la Enfermedad de Alzheimer.

# CONCLUSIONES

La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

## CONCLUSIONES

### Conclusiones del capítulo I

Durante este primer capítulo se estudiaron cinco extractos obtenidos mediante extracción con solventes, pertenecientes a las familias Hylidae y Leptodactylidae del Litoral argentino.

La caracterización analítica llevada a cabo mediante cromatografía, espectrometría de masas, geles de electroforesis y ácido bicinónico, mostró que los extractos son de una amplia complejidad, estando constituidos tanto por péptidos como por proteínas. Solamente se observó la presencia de alcaloides en uno de los extractos.

El estudio de actividad biológica *in vitro* frente a las colinesterasas (AChE y BChE) puso de manifiesto la capacidad inhibitoria de dos de los extractos estudiados: *B. cordobae* y *P. minuta* (Hylidae). Los análisis de las cinéticas de inhibición permitieron concluir que *B. cordobae* poseen una inhibición de tipo no competitiva, mientras que *P. minuta* presentó una inhibición competitiva frente a las colinesterasas. Mediante la TLC-bioautografía, se evidenció que compuestos de naturaleza peptídica y/o proteica son fundamentalmente los responsables de la inhibición de las colinesterasas en ambos extractos. Además, ambos extractos mostraron ser activos contra otros blancos terapéuticos fundamentales en las terapias frente a la EA, al inhibir la enzima MAO-B, poseer actividad antioxidante y ser capaz de quelar biometales como el hierro.

Respecto a la toxicidad, el extracto de *P. minuta* no resultó ni hemolítico ni citotóxico a las concentraciones que resultó activo; mientras que *B. cordobae* presentó cierto grado de toxicidad, aunque impero su bioactividad.

Con esto se demuestra y confirma la potencialidad que poseen las especies de anfibios como agentes multi-objetivo de los blancos terapéuticos de la Enfermedad de Alzheimer, sentando las bases necesarias para continuar con el estudio en profundidad de las especies *B. cordobae* y *P. minuta* a fin de aislar los péptidos bioactivos que las constituyen.

---

## Conclusiones capítulo II

En este segundo capítulo, se realizó la purificación mediante HPLC en fase reversa de los extractos activos de las especies *B. cordobae* y *P. minuta*. A las fracciones purificadas se les evaluó la capacidad inhibitoria frente a las enzimas colinesterasas AChE y BChE. Se obtuvieron y analizaron las fracciones BcI y BcII de *B. cordobae* y PmII de *P. minuta*. Se realizó el secuenciamiento peptídico *de novo* a través de espectrometría de masa en tándem (ESI-MS/MS) de las dichas fracciones bioactivas. Mediante el estudio peptidómico se lograron identificar 135 secuencias, de las cuales 19 fueron seleccionadas (en función de su *Score* de confianza) para continuar con las investigaciones. De estas 19 secuencias, 15 fueron de la fracción BcI, 3 de BcII y solo 1 de PmII.

Los estudios *in silico* de caracterización fisicoquímica permitieron comprobar que las secuencias son de tipo carboxiamida, hecho común en péptidos naturales. Además, se pudo observar que los péptidos son de una longitud de cadena relativamente corta, cargados tanto positiva como negativamente, y de media a baja hidrofobicidad. Estos parámetros se mostraron en concordancia con los reportados para péptidos bioactivos. Por otro lado, se utilizaron herramientas computacionales para predecir las estructuras secundarias de los péptidos, encontrándose que estos poseen regiones tanto de hélices  $\alpha$  como de *Coil*, no observándose conformación  $\beta$  o lamina plegada.

Se llevaron a cabo estudios comparativos de las secuencias identificadas frente a secuencias peptídicas reportadas en base de datos, a fin de conocer la novedad de estas. En base a esto se pudo concluir que las secuencias son novedosas, presentando una similitud no mayor al 45 % con secuencias reportadas. Notablemente, en su mayoría las similitudes se hallaron con PAMs aislados de pieles de anfibios.

Por último, los estudios evolutivos de las secuencias permitieron evidenciar péptidos filogenéticamente relacionados entre sí.

## Conclusión capítulo III

Durante este capítulo se realizó la síntesis química en fase sólida mediante metodología Fmoc de diecinueve péptidos identificados de los extractos de las pieles de *B. cordobae* y *P. minuta*. Estos análogos generados fueron evaluados frente a los cinco

---

blancos terapéuticos de la EA, como agentes antioxidantes y quelantes, y frente las enzimas MAO-B, AChE y BChE.

Se observó para las colinesterasas que los péptidos de la serie BcI fueron los más activos. Frente a la AChE, BcI-4 fue el de mayor actividad, con valores de inhibición que superan o están en el orden de actividad de los fármacos comerciales. Además, BcI-4 mostró inhibir la AChE de forma reversible no competitiva, mediante la interacción con los residuos del sitio PAS. En cuanto a la BChE, los análogos de mayor actividad fueron BcI-5, BcI-13 y BcI-14, resultando todos ser inhibidores de tipo reversible no competitivos. BcI-5, fue notablemente activo, con valores que superan tanto a los fármacos Galantamina y Donepezilo.

La actividad de MAO-B se vio inhibida por los análogos BcI-4, BcI-13, BcI-14 y BcI-15. Dentro de los cuales BcI-4 resultó el de mayor potencia. Estos estudios, evidenciaron la capacidad de los análogos BcI-4, BcI-13 y BcI-14 de modular tanto a las enzimas colinesterasas como a la monoamino oxidasa B. Por otro lado, los análogos mostraron la capacidad de actuar como agentes neuroprotectores, presentando actividad antioxidante y quelante del ion  $Fe^{2+}$ . Los análogos BcI-15 y BcI-4 fueron notablemente antioxidantes, mientras que BcI-4, además, fue capaz de quelar al  $Fe^{2+}$ . Los análogos más activos no resultaron hemolíticos a concentraciones de bioactividad.

Los análisis de bioactividad *in vitro*, los estudios cinéticos, así como los estudios computacionales de *docking* flexible y dinámica molecular, pusieron de manifiesto que los análogos de la serie BcI poseen la capacidad de actuar como agentes multimoduladores de las vías involucradas en la Enfermedad de Alzheimer, siendo sumamente prometedores para la futura generación de moléculas terapéuticas.

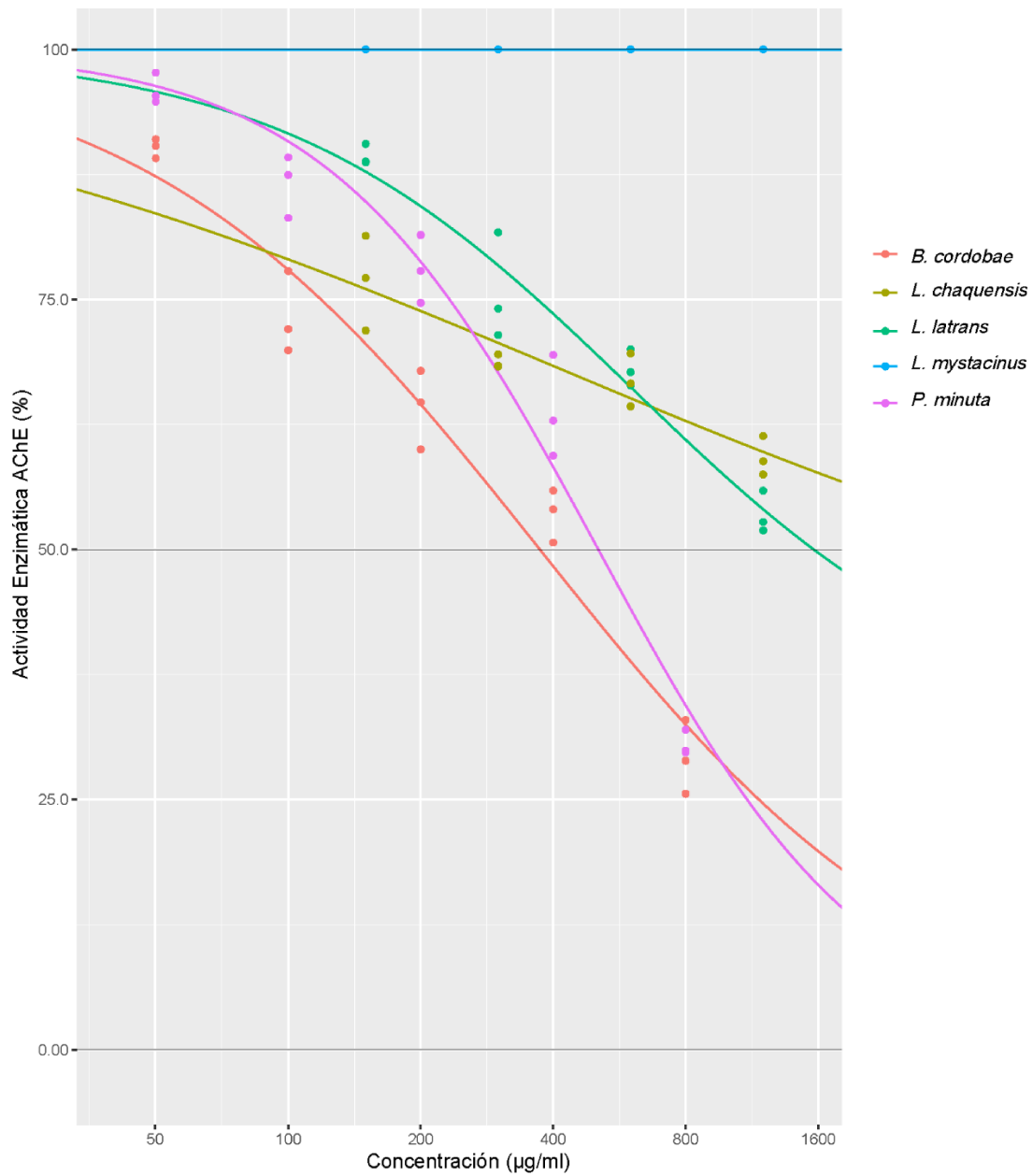


# MATERIAL ANEXO

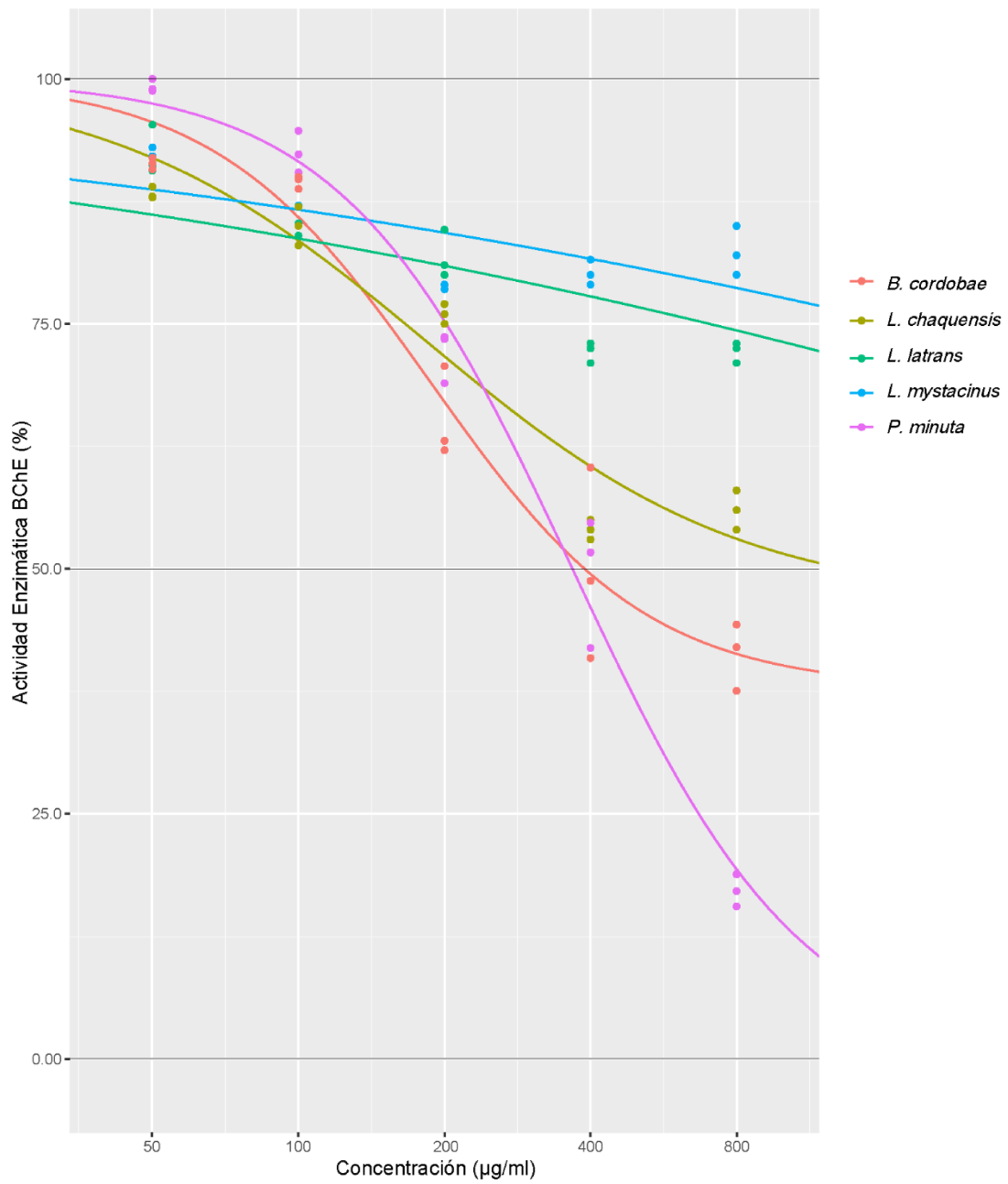
La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

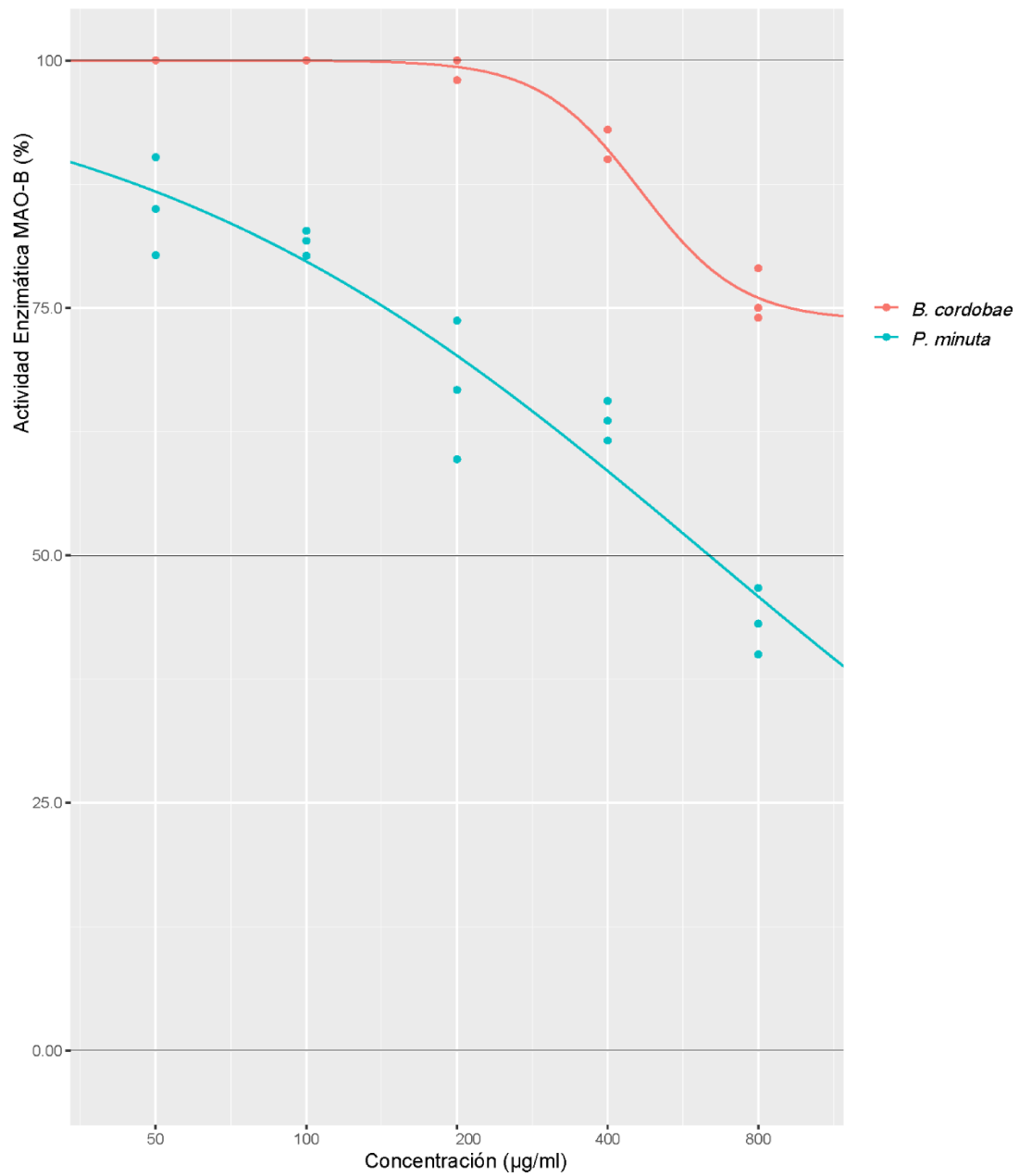
## MATERIAL ANEXO



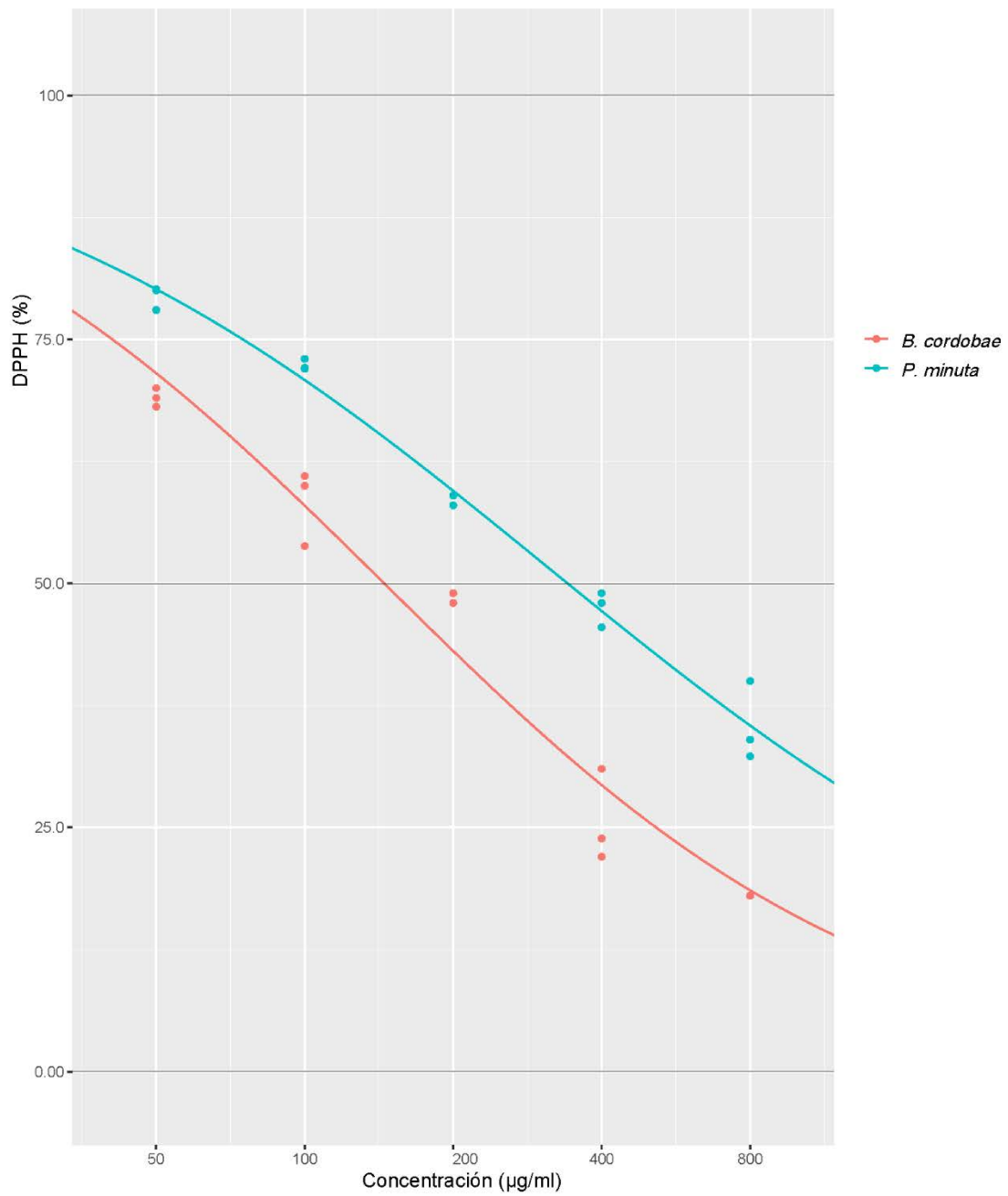
**FIGURA A1.** Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la AChE frente a los extractos. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.



**FIGURA A2.** Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la BChE frente a los extractos. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.



**FIGURA A3.** Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la MAO-B frente a los extractos de *P. minuta* y *B. cordobae*. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.



**FIGURA A4.** Curva de dosis respuesta de la actividad antioxidante de los extractos, expresada como % de radical DPPH. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.

**TABLA A1.** secuencias de *Score* < 80 % identificadas de *B. cordobae* y *P. minuta* mediante el análisis proteómico del software Peaks Studio y ESI-MS-MS

<b>Acrónimo</b>	<b>Secuencia<sup>(a)</sup></b>	<b>% Global Confianza</b>	<b>Ión m/z</b>	<b>z</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>% Local de confianza<sup>(b)</sup></b>
<b>Serie BcI</b>						
BcI-16	TM(Ox)ELAHQR	79	501,2406	2	1000,476	93 95 99 99 88 53 56 52
BcI-17	HTANHPLDRKR	79	672,8699	2	1343,717	88 91 96 84 96 96 88 56 54 61 61
BcI-18	GSKAFALAATR	79	546,817	2	1091,6086	76 82 89 87 77 87 89 73 60 61 90
BcI-19	GSKKFPGQFLR	79	632,866	2	1263,7087	80 80 97 94 88 94 91 50 61 80 52
BcI-20	TLAFVELAKGV	79	574,3381	2	1146,6648	65 57 62 85 92 98 98 94 83 65 66
BcI-21	SGKVYVPASAR	78	567,8225	2	1133,6191	82 83 55 52 67 100 86 77 77 83 95
BcI-22	VLYPDFVIFYAPR	78	743,9006	2	1485,7656	43 47 48 93 93 96 98 96 65 85 90 79
BcI-23	KKFATVSLPR	78	573,8582	2	1145,6921	28 80 73 97 98 98 95 77 82 48
BcI-24	TLPAQVVAARAD	77	606,3397	2	1210,667	92 93 97 98 72 93 93 86 79 44 44 38
BcI-25	TPTVSLPGV	77	435,7541	2	8694,858	73 73 93 90 81 76 65 69 70
BcI-26	RKYVKSVR	77	518,3254	2	1034,6348	44 58 52 85 96 96 97 87
BcI-27	EEHQVVSR	77	556,2769	2	1110,5417	91 95 92 44 47 66 90 94 72
BcI-28	PSAPDHLGFYR	77	630,3107	2	1258,6094	37 48 54 93 93 97 97 96 83 83 61
BcI-29	HGKKGVPFGF	76	537,3032	2	1072,5.818	71 72 73 63 63 78 82 88 93 76
BcI-30	EPKPVADTLR	76	606,8271	2	1211,6509	60 60 62 83 89 94 94 96 75 76 45
BcI-31	QAAGVDTDGHLLGV	76	676,8413	2	1351,6731	56 69 76 67 67 83 92 93 92 91 94 84 45 50
BcI-32	PTGYGTTVFLTR	76	656,8459	2	1311,6824	50 57 77 92 80 81 88 87 90 75 79 52
BcI-33	GSKLHPERKAAA	75	632,8603	2	1263,7046	71 81 91 78 78 90 89 69 47 67 71 71
BcI-34	GSA AFLDKSQR	75	590,3145	2	1178,6042	85 86 95 77 67 75 95 73 65 55 54
BcI-35	FKKNADEVGGEAVAR	75	795,9192	2	1589,8162	32 64 51 68 98 99 99 99 96 92 90 85 37 37 80
BcI-36	HGCGYGFHLHGER	75	735,3228	2	1468,6418	34 45 67 95 96 91 87 89 96 88 68 69 50
BcI-37	HTEVGKKKGFT	75	616,3488	2	1230,6721	51 59 71 92 91 93 82 87 68 70 54

**TABLA A1 (cont.)** secuencias de *Score* < 80 % identificadas de *B. cordobae* y *P. minuta* mediante el análisis proteómico del software Peaks Studio y ESI-MS-MS

BcI-38	SADVGPVAAAGAR	74	571,2976	2	1140,5886	34 38 43 96 96 88 82 86 86 73 74 80 91
BcI-39	KKFLSGEDR	74	540,2963	2	1078,5771	28 54 55 85 91 85 86 98 87
BcI-40	KCKVVAA	74	359,7195	2	717,4207	41 76 85 92 76 76 76
BcI-41	FAKKGPAVSPLVPR	74	733,9492	2	1465,877	65 63 81 92 92 89 88 96 96 67 55 55 53 44
BcI-42	SPLLNAFER	74	523,7821	2	1045,557	54 54 89 92 72 83 78 82 61
BcI-43	FAGKGTKFLR	74	562,8373	2	1123,6501	62 58 72 79 84 87 97 74 76 51
BcI-44	GSVVPPAVT	74	413,7384	2	825,4596	78 79 95 98 48 72 60 61 72
BcI-45	AAAFKKA	74	389,231	2	776,4544	89 90 74 63 71 49 76 78
BcI-46	VPLHQQAAM(Ox)R	74	583,8041	2	1165,6025	69 79 97 95 62 57 88 67 67 55
BcI-47	EPALDDSAYGSR	73	640,7891	2	1279,5681	80 93 97 90 90 85 59 55 55 54 64 56
BcI-48	TM(Ox)SFTTTAPST	73	580,7628	2	1159,5068	68 70 86 89 94 88 71 57 54 55 71
BcI-49	TPVDHEVLLVHA	73	665,3665	2	1328,7087	71 67 73 68 65 73 90 97 96 61 66 49
BcI-50	GSLPLAGSAVLTR	73	621,3589	2	1240,7139	55 54 77 54 48 54 92 95 98 96 83 87 55
BcI-51	FTKKSPATAVGSR	73	675,385	2	1348,7463	34 33 38 96 99 97 96 98 72 63 61 86 76
BcI-52	SGFVRKSVR	73	518,3061	2	1034,5984	74 76 82 63 42 66 79 94 81
BcI-53	KKFALEPGVPR	73	621,3766	2	1240,729	28 86 72 91 93 96 69 60 68 78 60
BcI-54	KKFATVSLPR	73	573,8586	2	1145,6921	28 84 74 96 97 97 94 59 62 37
BcI-55	HRVVLSMAA	73	492,2776	2	982,5382	72 72 85 73 47 48 84 86 87
BcI-56	PSALAGHDNR	73	519,2573	2	1036,5049	35 47 56 99 96 93 88 72 75 65
BcI-57	FAKKFPSLVGR	73	625,3805	2	1248,7341	89 87 88 93 67 76 72 68 57 57 45
BcI-58	CHYDESGPSLVHR	73	750,3378	2	1498,6624	28 52 44 74 88 99 98 94 87 75 75 73 58
BcI-59	SGKFSAGNLF	72	620,8301	2	1239,636	76 72 62 61 79 68 66 78 69 83 92 62
BcI-60	DNGVPEANEALER	72	707,354	2	14126,531	63 55 68 72 91 91 92 73 90 86 59 62 39
BcI-61	FKGRITTLR	72	489,796	2	977,577	62 67 80 82 88 76 76 45
BcI-62	SGGFRSEKATVASGV	72	726,8799	2	1451,7368	80 84 47 41 40 96 97 98 99 91 86 68 59 46 47

**TABLA A1 (cont.)** secuencias de *Score* < 80 % identificadas de *B. cordobae* y *P. minuta* mediante el análisis proteómico del software Peaks Studio y ESI-MS-MS

BcI-63	GSLAAFEKTR	72	604,8221	2	1207,6196	68 68 91 90 67 68 90 41 51 86 72
BcI-64	KKFHLTDAER	72	622,8401	2	1243,6672	28 33 76 71 94 83 83 88 90 71
BcI-65	AAPLEVLYMR	72	581,8135	2	1161,6216	75 85 86 91 84 76 63 54 50 52
BcI-66	SGKYLGELLR	72	568,3312	2	1134,6396	80 84 84 55 41 51 98 91 87 43
BcI-67	KATRRGSAA	71	459,2686	2	916,5202	65 67 57 59 53 82 83 89 89
BcI-68	RFKTLAGR	71	474,7907	2	947,5665	57 52 39 61 84 90 90 97
BcI-69	TEMALLESR	71	525,2662	2	1048,5222	35 43 45 97 98 92 83 84 65
BcI-70	GSLLARGLNVR	71	578,3571	2	1154,6882	67 67 88 70 51 63 88 80 64 88 59
BcI-71	AFKKTVDLPR	71	587,8555	2	1173,687	49 48 71 80 93 93 86 72 74 46
BcI-72	SGAAFQGNLAR	71	610,3364	2	1218,647	87 87 86 63 61 70 63 49 61 85 88 54
BcI-73	YLVKGCGLGV	71	591,8117	2	1181,6113	30 40 53 98 93 88 79 75 89 90 58 59
BcI-74	TPMRSGPEPLLR	71	677,3744	2	1352,7234	58 57 67 76 66 52 67 94 93 83 91 49
BcI-75	SGKFLLENR	71	581,838	2	1161,6506	85 85 56 51 61 99 78 64 70 61
BcI-76	KTGPPVAGDDAPGV	71	427,5544	3	1279,6409	60 46 40 38 56 68 93 97 94 89 87 81 71 74
BcI-77	KNVHVLTVDAAA	71	619,3527	2	1236,6826	47 41 44 58 95 93 71 71 90 79 80 80
BcI-78	AANKKRAA	71	415,2546	2	828,4929	80 79 51 63 53 65 96 78
BcI-79	TFGLPLPVTAKATT	70	737,4376	2	1472,8601	59 61 71 75 74 84 67 65 73 69 59 78 90 61
BcI-80	YDEALDHDGVVEVPR	70	857,4053	2	1712,8005	53 69 52 81 94 97 97 94 84 85 90 51 36 35 39
BcI-81	PSDGFSFLLHVPQT	70	737,3772	2	1472,73	68 70 83 85 84 84 82 77 51 55 60 55 57 75
BcI-82	SGRFLAVELTGK	70	639,3696	2	1276,7139	78 78 81 61 52 88 93 95 93 50 36 37
BcI-83	PSENPVKHRGKT	70	675,3685	2	1348,7212	55 58 77 70 89 94 94 63 45 68 74 54
<b>Serie BcII</b>						
BcII-4	DETFEEAGATGR	79	641,7813	2	1281,5474	84 83 95 99 98 81 77 44 48 70 86 90
BcII-5	TLPAQVVAARAD	78	606,3416	2	1210,6670	94 93 94 94 64 88 91 90 85 51 51 40
BcII-6	APGQVRAKKATR	78	321,4482	4	1281,7629	77 69 76 46 60 62 96 97 86 84 96 85



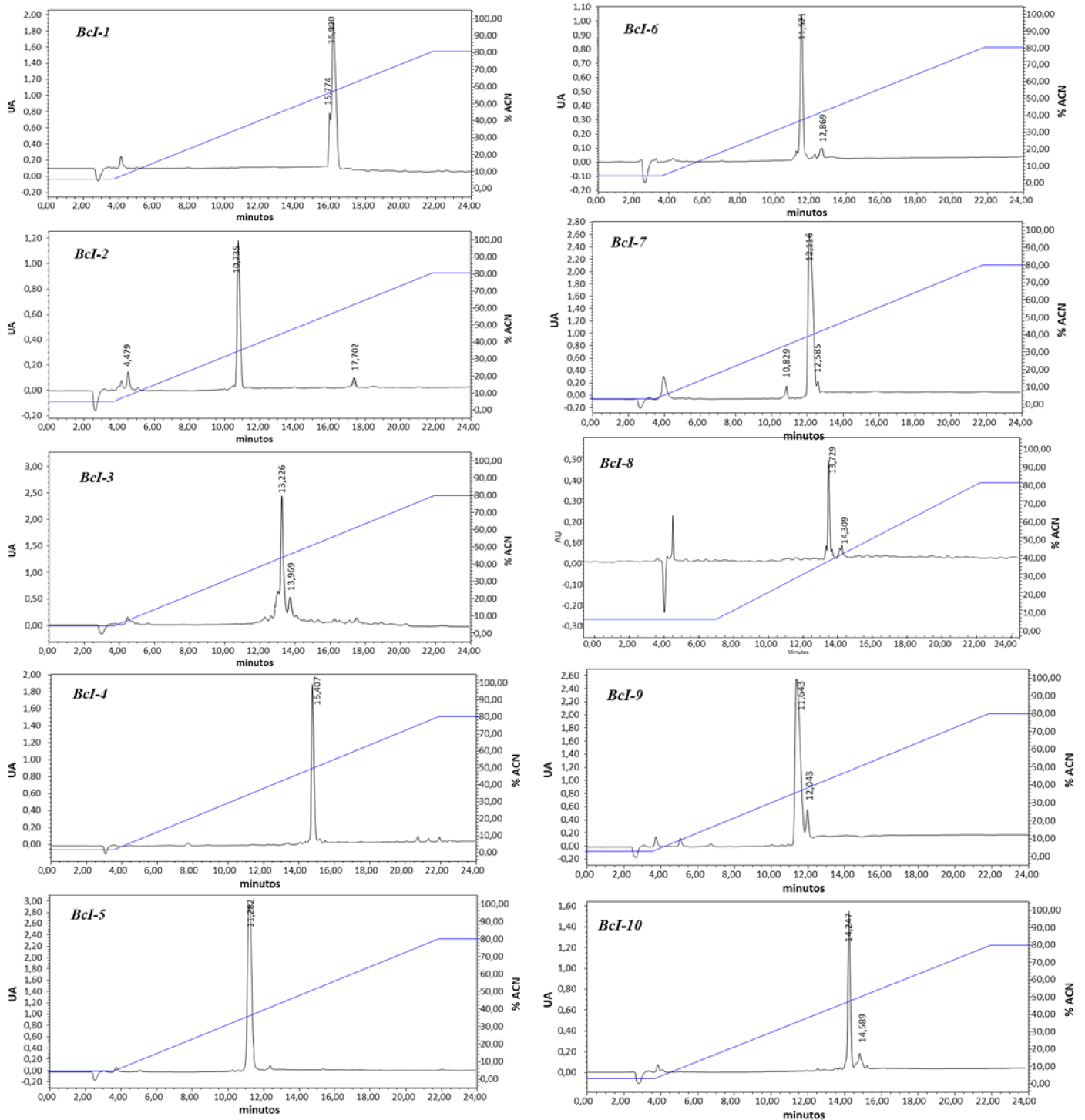
**TABLA A1 (cont.)** secuencias de *Score* < 80 % identificadas de *B. cordobae* y *P. minuta* mediante el análisis proteómico del software Peaks Studio y ESI-MS-MS

BcII-7	KVAAVGVAK	77	421,7752	2	841,5385	97 90 87 49 40 50 93 93 96
BcII-8	VPSGPDGR	77	392,7004	2	783,3875	27 85 84 74 73 90 96 85
BcII-9	KPLLKTESAKSAKSK	77	808,4896	2	1614,668	80 70 73 94 94 86 77 77 78 80 51 54 85 93 56
BcII-10	SPLGANTPKPED	76	613,3066	2	1224,5986	74 77 90 70 61 62 89 94 91 75 76 53
BcII-11	KPLKTESAKSAKSK	76	376,4775	4	1501,8828	60 59 71 92 95 88 82 83 88 55 55 82 94 53
BcII-12	EEAGM(Ox)GSSHE	76	525,1926	2	1048,3767	96 83 53 50 63 76 79 83 98 74
BcII-13	KPRKADGDSKVEKSKGK	75	465,2676	4	1857,0432	53 54 56 58 73 84 81 86 91 93 94 86 69 65 84 92 60
BcII-14	QGGVPAVAKAKTR	75	428,2619	3	1281,7517	73 92 94 53 36 32 47 98 99 96 90 91 71
BcII-15	EPAAM(Ox)M(Ox)PCH	74	509,6960	2	1017,3718	91 88 80 79 79 79 59 66 46
BcII-16	M(Ox)ETREHCH	74	529,7101	2	1057,4070	95 82 65 65 76 58 81 69
BcII-17	KPLLKTESAKSAKSK	74	404,7487	4	1614,9668	81 66 68 91 93 90 80 73 75 85 48 47 71 88 47
BcII-18	HCEKQEEFSSSEE	73	784,8093	2	1567,6096	49 69 79 71 54 91 86 55 82 78 81 81 76
BcII-19	PSGPCAAGAVGLDGEPGPGSG	73	848,3866	2	1694,7568	40 52 57 89 91 94 87 78 62 64 75 51 52 77 83 91 94 83 70 72
BcII-20	EESSCDCGE	73	479,6449	2	957,2692	99 95 95 75 71 45 50 64 62
BcII-21	HCEEGTYSEE	73	592,2156	2	1182,4136	55 89 96 98 69 52 46 62 86 75
BcII-22	EEESSCGEEEEKEE	73	548,2010	3	1641,5835	96 91 58 57 58 63 58 64 86 95 80 75 81 58
BcII-23	SPGALGAVGSAGPAGKSGNR	73	570,9668	3	1709,8809	35 46 59 79 74 73 84 97 95 92 94 95 96 93 89 61 53 45 48 45
BcII-24	EPVDDAGEE	72	480,6927	2	959,3719	76 73 76 88 61 50 57 73 100
BcII-25	KTGPEPAPAAKKGSKKAVTK	72	399,6408	5	1993,1682	76 43 45 77 67 47 39 94 91 90 94 96 76 64 67 60 58 72 93 94
BcII-26	QGMPVGGVAPSGDGHGGPQG	72	881,3959	2	1760,7900	42 43 58 68 82 78 65 69 74 74 67 82 97 98 94 93 97 73 40 51
BcII-27	EEEAPEEEM(Ox)NFAGE	72	813,8141	2	1625,6038	98 98 94 81 85 99 100 75 34 39 33 50 60 62
BcII-28	LAGAGYFGSAAAGSLGPVGHAEAGAGGV	72	805,4006	3	2413,2024	94 93 88 58 51 51 42 43 43 63 79 85 91 93 97 9 6 96 96 94 94 94 86 47 40 56 53 44 46
BcII-29	QPVGQQGGKVRAKAKTR	72	362,6190	5	1808,0493	47 48 54 65 53 57 88 89 86 68 60 77 79 90 88 94 78

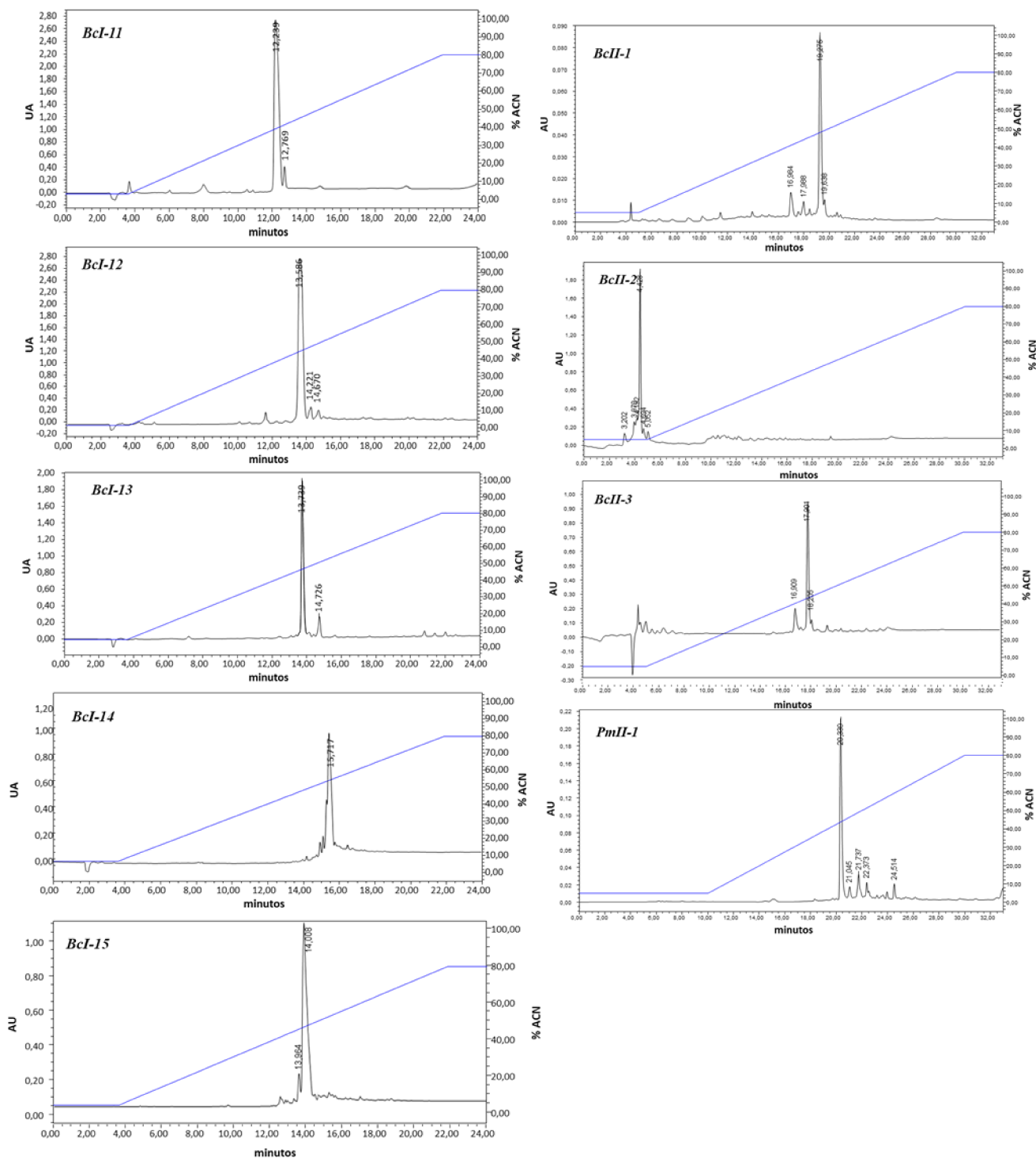
**TABLA A1 (cont.)** secuencias de *Score* < 80 % identificadas de *B. cordobae* y *P. minuta* mediante el análisis proteómico del software Peaks Studio y ESI-MS-MS

BcII-30	PSCFAPGNTGSGP	71	596,2542	2	1190,5027	56 69 83 73 77 65 65 62 81 89 72 65 71
BcII-31	EAAAPGEGGEEKNELPDAAMSTGE	71	806,6852	3	2417,0176	93 76 68 54 71 77 63 44 45 71 92 89 75 89 89 73 67 78 76 43 43 54 84 89
BcII-32	KPRKSEPGCPAKDAGKVTAGKERPTR	71	553,7102	5	2763,4924	87 63 55 64 76 83 78 79 88 94 99 96 92 86 80 84 93 67 45 41 43 67 42 49 48 44
BcII-33	KPAAPPKPTVGPPK	71	346,9622	4	1383,8237	74 54 58 86 91 83 77 75 51 41 41 74 92 93
BcII-34	LGVGVGSSGPVLLGPDGR	71	546,3013	3	1635,8943	55 53 63 93 82 69 67 71 52 45 43 74 90 81 74 82 95 83
BcII-35	KPLKTESAKSAKSK	71	501,6342	3	1501,8828	65 66 74 88 83 76 71 72 78 42 44 78 93 58
BcII-36	LVGPAGARGPSGMTPL	71	526,6210	3	1576,8396	95 95 98 96 92 69 67 83 88 78 78 85 36 36 35 38 31
BcII-37	PSGLCEGKHNGELGPGS	70	819,8761	2	1637,7468	48 54 63 73 86 84 71 54 56 59 75 78 86 89 79 68 71
BcII-38	KPKLLTESAKGTKSK	70	404,7499	4	1614,9668	75 56 47 59 89 84 74 75 77 84 46 48 81 94 63
BcII-39	KCHEEEEEVTGE	70	774,3163	2	1546,6094	64 45 52 83 98 98 98 96 55 43 43 53 84
BcII-40	KSVTTGAPLLKASKSK	70	324,0008	5	1614,9668	84 78 73 56 55 55 75 79 87 91 89 51 47 78 74 49
<b>Serie PmII</b>						
PmII-2	HCEEDHDAEERN	78	742,2825	2	1482,5430	52 62 84 91 91 95 99 98 98 72 44 43
PmII-3	VVSPAPRP	76	411,7458	2	821,4759	99 99 91 88 83 58 63 27
PmII-4	EHDGGYGGEFY	75	615,7387	2	1229,4624	74 78 74 56 56 81 83 81 83 92 71
PmII-5	APRPGALL	74	397,7470	2	793,4810	85 83 86 46 47 56 89 99
PmII-6	LLGDADPPAL	73	491,2654	2	980,5178	100 98 92 90 76 56 41 42 44 91
PmII-7	VTRPVQY	73	431,7430	2	861,4708	91 90 97 95 45 47 47
PmII-8	VVSPAPHPQ	73	466,2534	2	930,4923	90 90 78 76 80 84 61 47 48
PmII-9	VVSPAPRPQ	72	475,7752	2	949,5345	98 98 96 97 92 84 31 28 26
PmII-10	LLGDWGHAL	72	491,2661	2	980,5079	99 97 89 76 61 54 39 41 92
PmII-11	VVSPAPRAGPLL	72	588,8593	2	1175,7026	99 99 98 97 93 70 70 50 34 24 38 86
PmII-12	HGDAGPAAGVPLK	72	595,3161	2	1188,6250	85 90 94 93 88 79 81 85 81 45 36 41 33

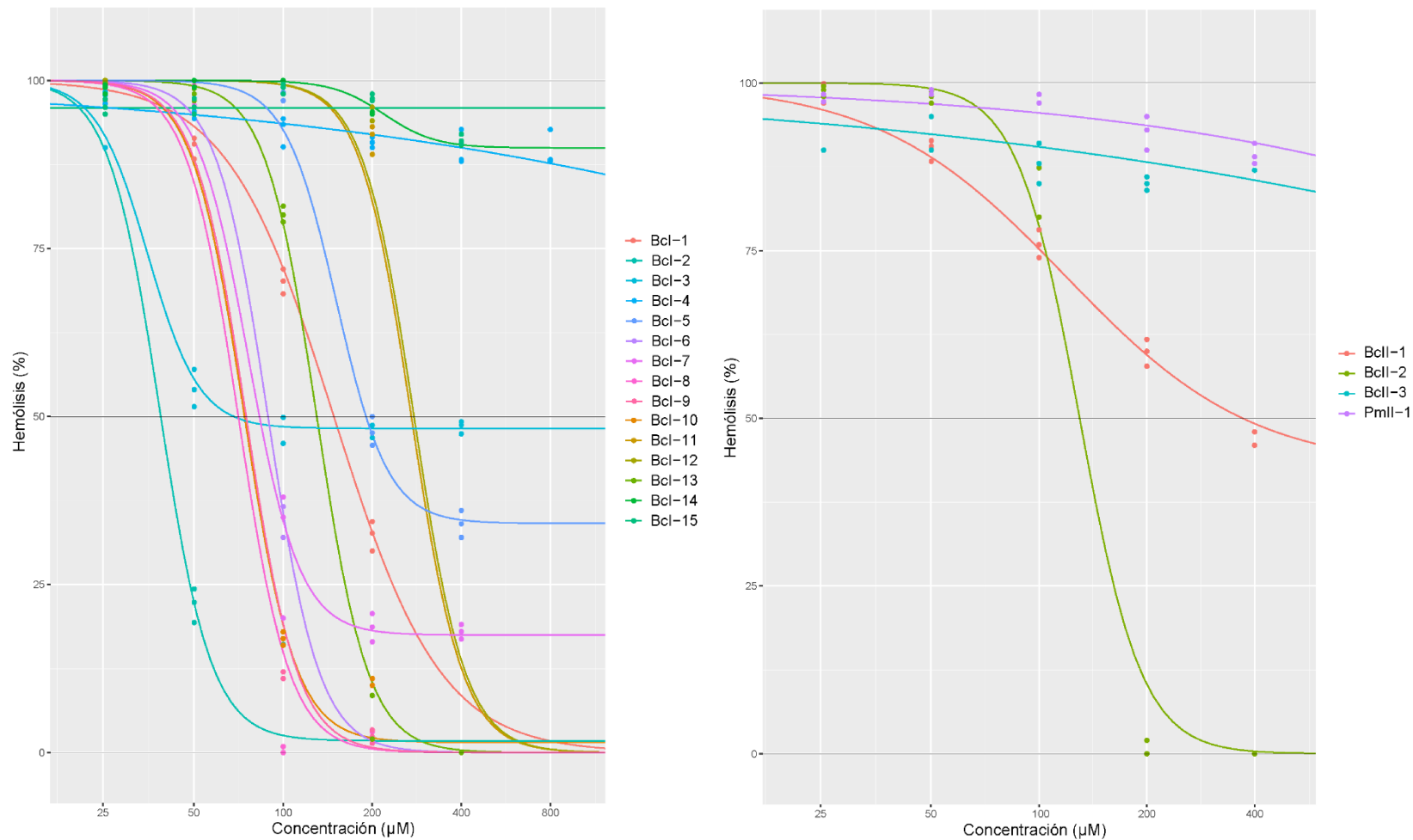
Secuenciamiento por ESI-MS-MS. a) M(ox): metionina oxidada. c) porcentaje de confianza por aminoácido.



**FIGURA A5.** Perfiles de HPLC en fase reversa para los análogos sintetizados. Columna analítica C18. Gradiente lineal (5 a 80 %) de solución A (0,1 % TFA en agua) a solución B (0,1 % TFA en ACN) por 33 min. Flujo de 0,8 ml/min. Detección: 220 nm.



**FIGURA A5 (cont.).** Perfiles de HPLC en fase reversa para los análogos sintetizados. Columna analítica C18. Gradiente lineal (5 a 80 %) de solución A (0,1 % TFA en agua) a solución B (0,1 % TFA en ACN) por 33 min. Flujo de 0,8 ml/min. Detección: 220 nm.



**FIGURA A6.** Curva de dosis respuesta de la actividad Hemolítica de los análogos. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot.

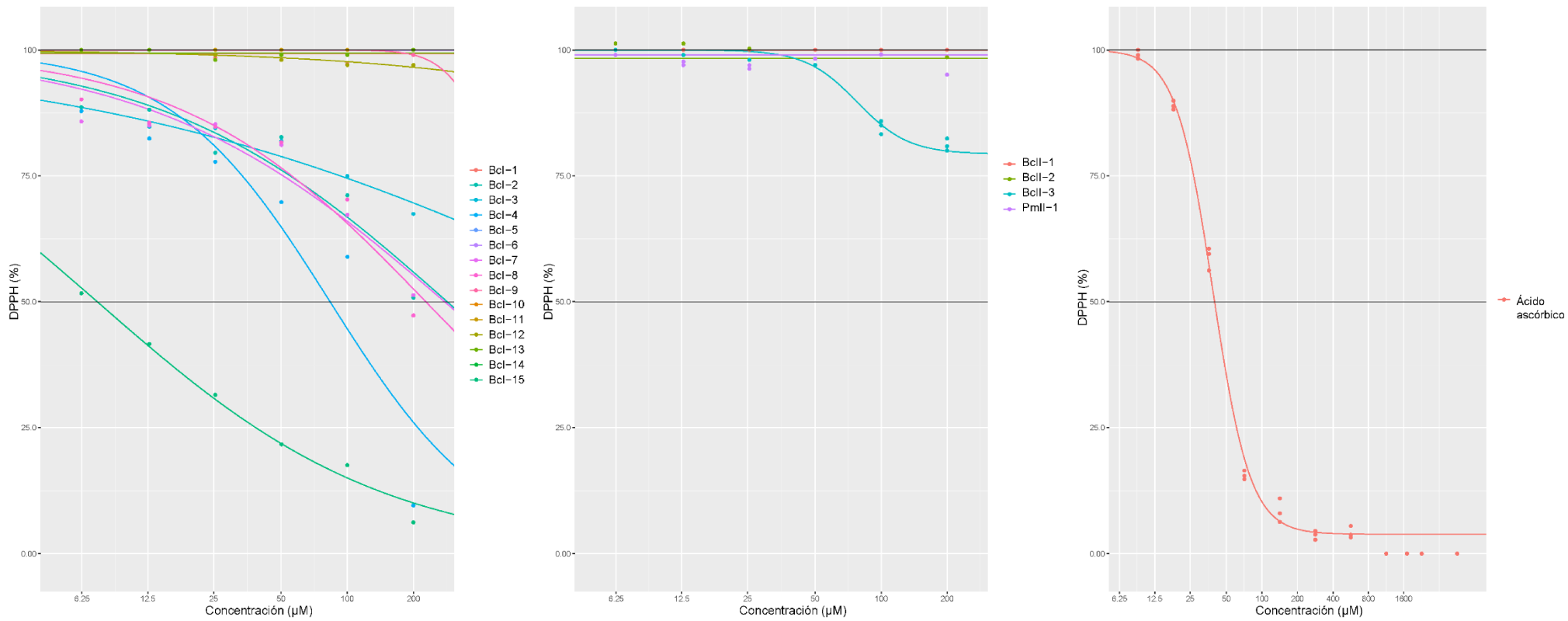


FIGURA A7. Curva de dosis respuesta de la actividad antioxidante de los análogos y el ácido ascórbico. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.

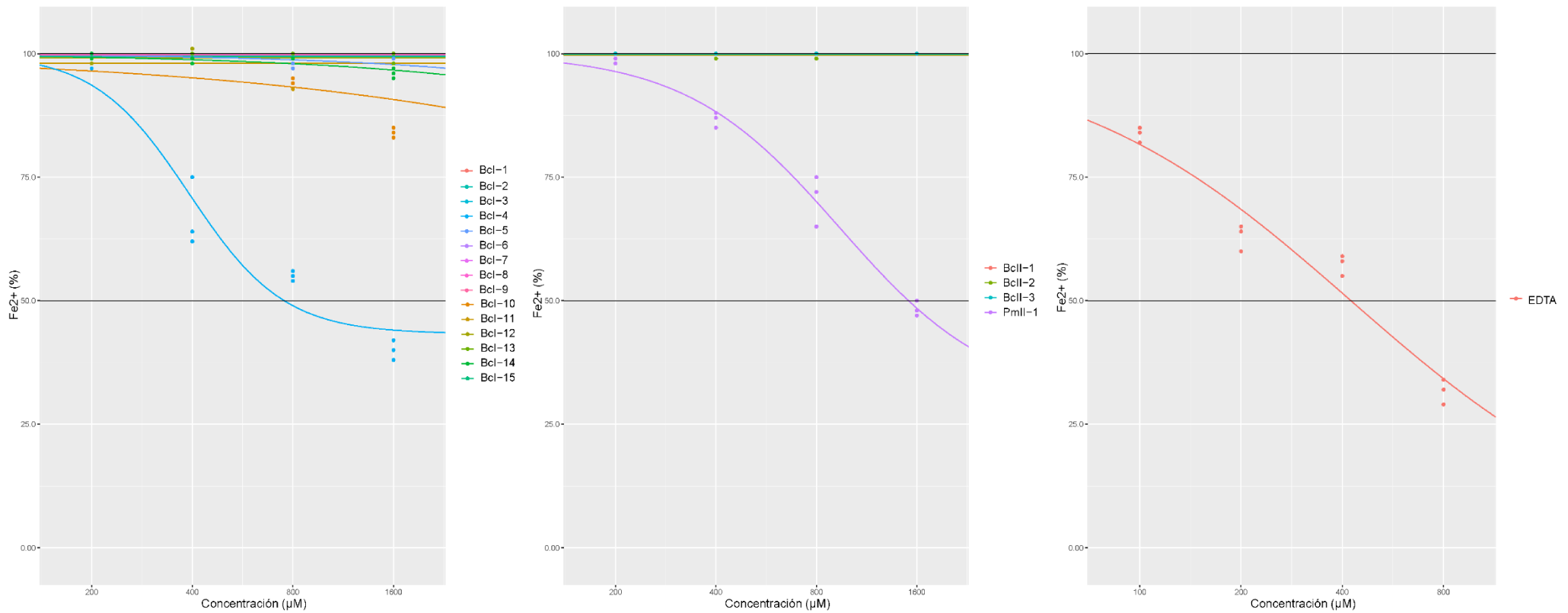
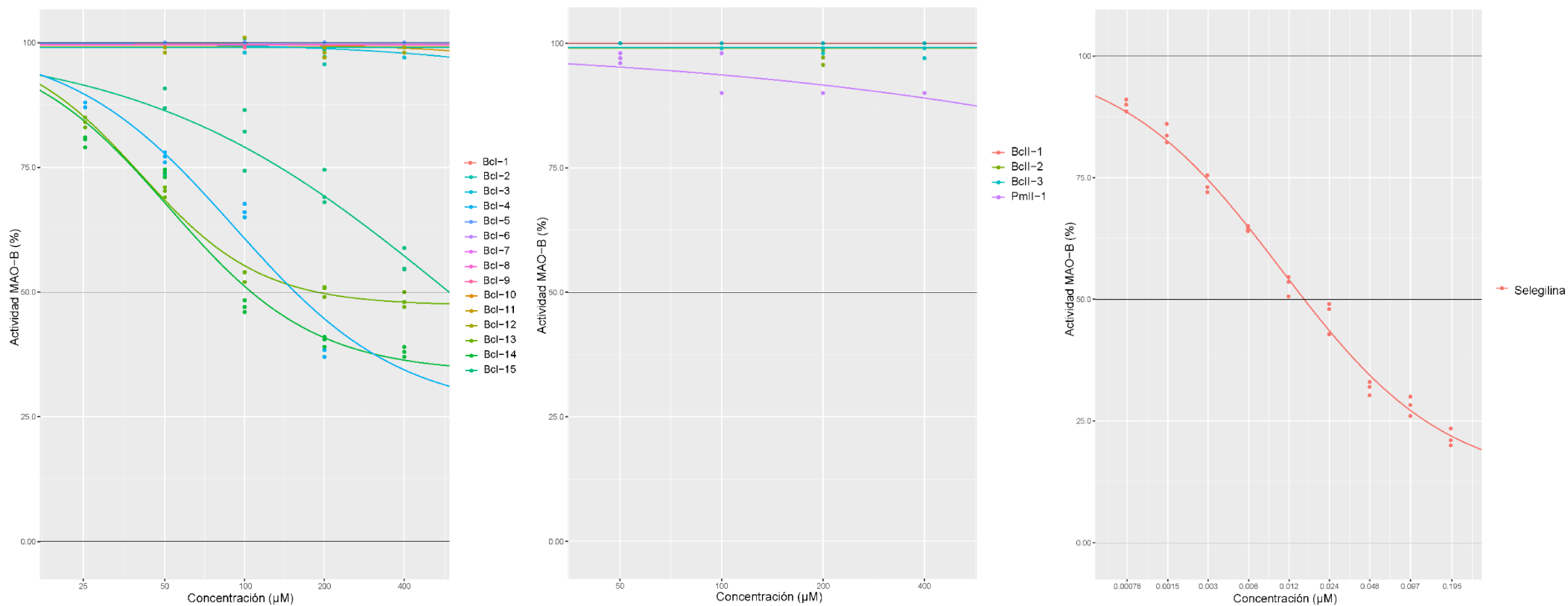
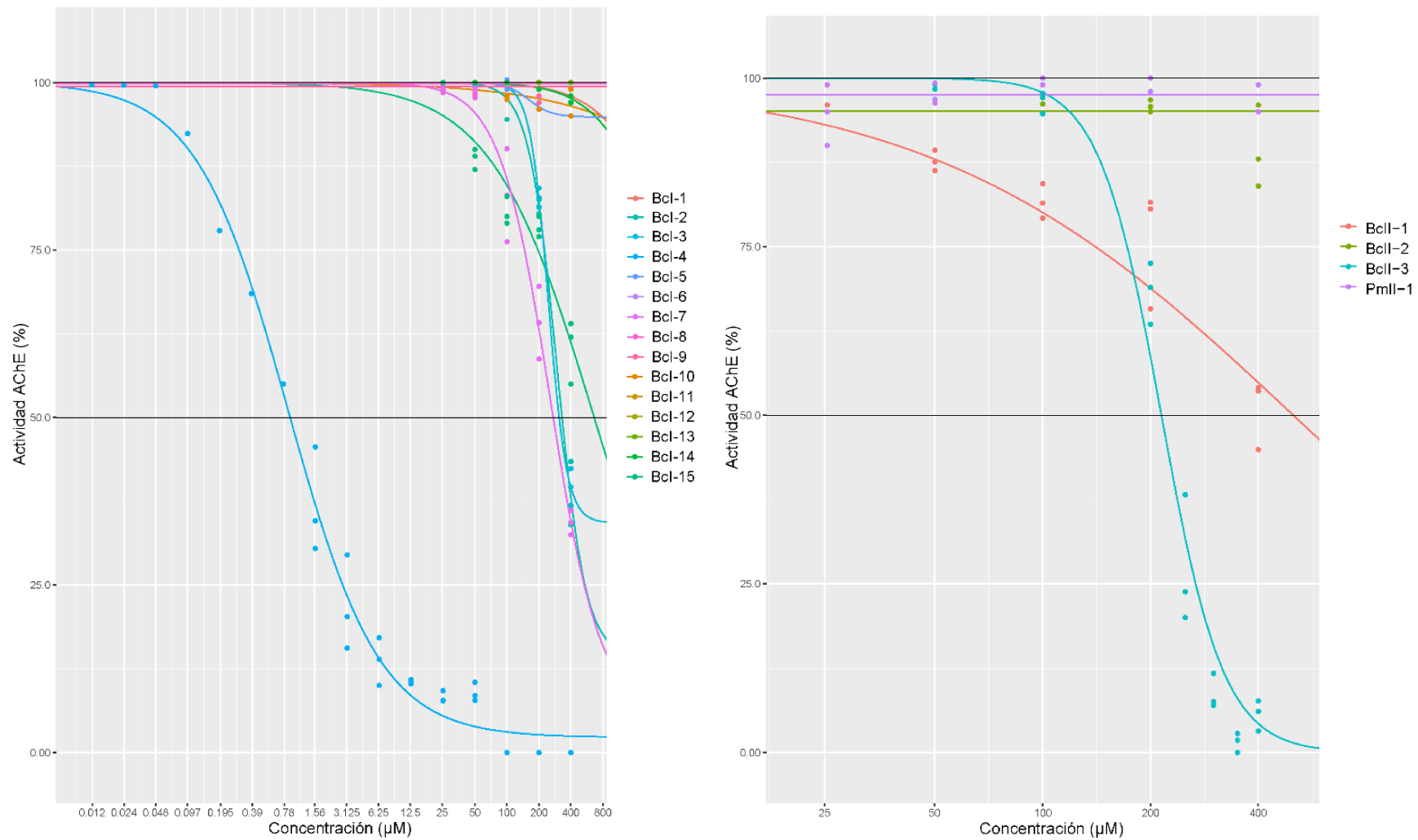


FIGURA A8. Curva de dosis respuesta de la actividad quelante de los análogos y el EDTA. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.



**FIGURA A9.** Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la MAO-B frente a los análogos y la Selegilina. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.





**FIGURA A10.** Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la AChE frente a los análogos. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.

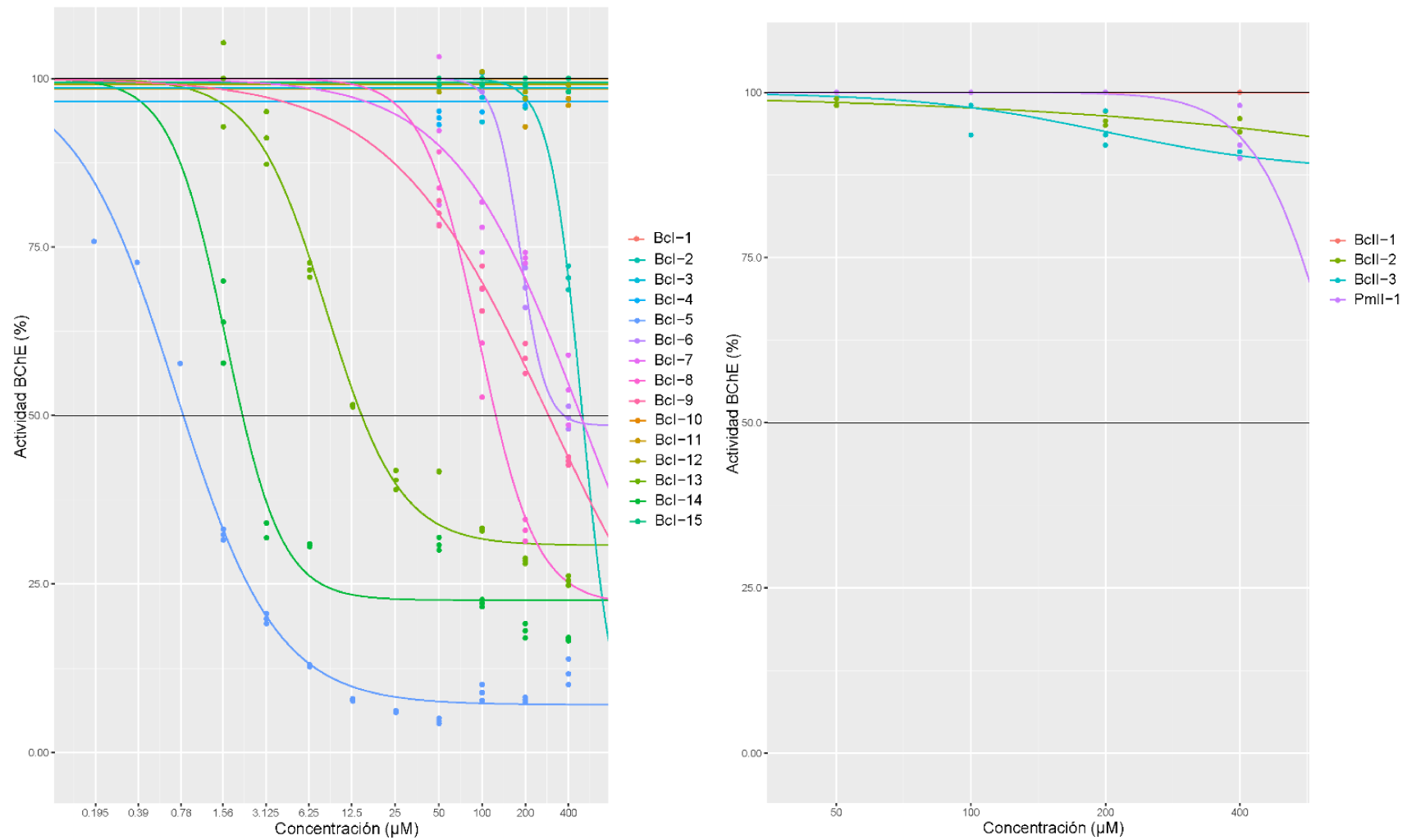
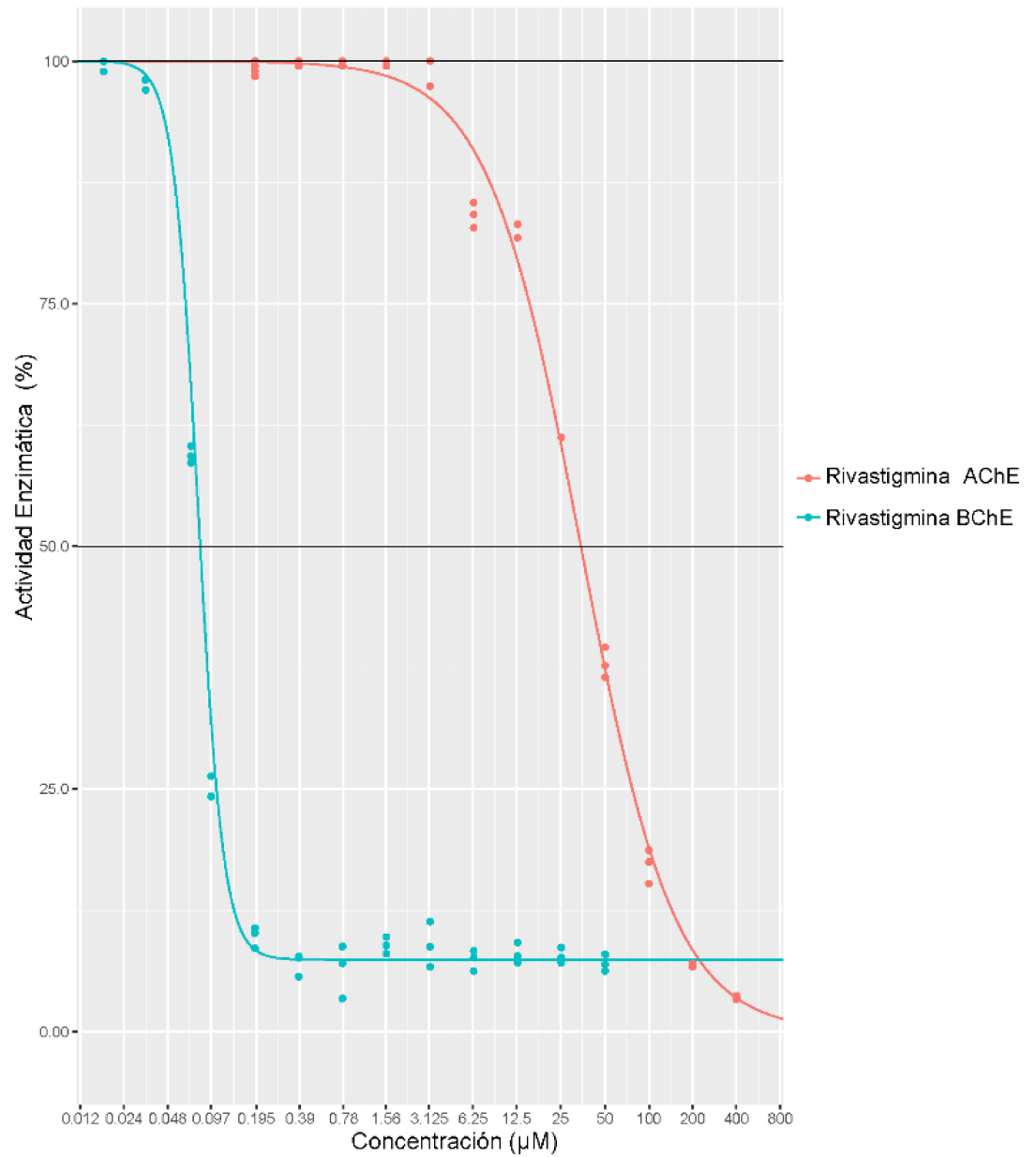


FIGURA A11. Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la BChE frente a los análogos. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2



**FIGURA A12.** Curva de dosis respuesta de la actividad enzimática de la AChE y la BChE frente a la Rivastigmina. Gráfico realizado con el software R, y el paquete ggplot2.

# REFERENCIAS

La piel de los anfibios como  
fuente de purificación y  
aislamiento de péptidos  
terapéuticos para la Enfermedad  
de Alzheimer

Lic. Roque Spinelli

## REFERENCIAS

- [1] W Duellman, L Trueb (1994) Introduction to the amphibians, En: Biology of amphibians, (Ed: W Duellman), The John Hopkins University Press, p. 1-7.
- [2] DR Frost, R. W. McDiarmid, I J. R. Mendelson (2008) Anura: Frogs. Crother, B. I. ed., Scientific and Standard English Names of Amphibians and Reptiles of North America North of Mexico, With Comments Regarding Confidence in Our Understanding. *Herpetological Circular* 37: 2–12
- [3] TI Storer, RL Usinger, RC Stebbins, JW Nybakken (1979) The frog as a representative animal, En: General Zoology, (Ed: J McGraw-Hill), McGraw-Hill publications in the zoological sciences, p. 19-39
- [4] AmphibiaWeb (2020) Amphibia Web University of California. <https://amphibiaweb.org>. Acceso: 26 de octubre del 2020
- [5] DR Frost (2010) Amphibian species of the world: an online reference. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Acceso: 20 de octubre del 2020
- [6] JD Lynch (1976) The species groups of the South American frogs of the genus *Eleuthedactylus* (Leptodactylidae), (Ed: Museum of Natural History), University of Kansas. Museum of Natural History, p.1-24
- [7] M Tyler, R Wassersug, B Smith (2007) How frogs and humans interact: Influences beyond habitat destruction, epidemics and global warming. *Applied Herpetology* 4 (1):1-18
- [8] T Halliday, K Adler (2007) Los anfibios, En: La gran enciclopedia de los Anfibios y Reptiles, (Ed: T Halliday), LIBSA Editorial, p.12-98
- [9] RL Morrison (1995) A transmission electron microscopic (TEM) method for determining structural colors reflected by lizard iridophores. *Pigment Cell Res* 8 (1):28-36
- [10] RC Toledo, C Jared (1995) Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *CBP* 111 (1):1-29
- [11] WE Duellman (1999) Distribution patterns of amphibians in South America: A Global Perspective, En: Patterns of Distribution of Amphibians: A Global Perspective, (Ed: WE Duellman), JHU Press, p.255-328

- 
- [12] G Delfino (1976) Structural and ultrastructural aspects of the cutaneous granular glands in *bombina variegata* (amphibia anura discoglossidae). *Ital J Zool.* 10 (4):421-448
- [13] JW Mills, BE Prum (1984) Morphology of the exocrine glands of the frog skin. *Am J Anat* 171 (1):91-106
- [14] LA Rollins-Smith, JD King, PF Nielsen, A Sonnevend, JM Conlon (2005) An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). *Regul Pept* 124 (1-3):173-178
- [15] A Gomes, B Giri, A Saha, R Mishra, SC Dasgupta, A Debnath, A Gomes (2007) Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J Exp Biol* 45 (7):579-593
- [16] DJ Newman, GM Cragg (2020) Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 83 (3):770-803
- [17] JM Conlon, M Mechkarska, ML Lukic, PR Flatt (2014) Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides* 57: 67-77
- [18] JW Daly (1995) The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1):9-13
- [19] JW Daly, HM Garraffo, TF Spande. (1999) Alkaloids from amphibian skins. En *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, ed. SW Pelletier, Pergamon, New York, P. 1-161.
- [20] MJ Tyler, DJ Stone, JH Bowie (1992) A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 28 (4):199-200
- [21] W Duellman, L Trueb (1994) Morphology, En: *Biology of amphibians*, (Ed: W Duellman), The John Hopkins University Press, p. 287-366.
- [22] AC Nascimento, LC Zanotta, CM Kyaw, EN Schwartz, CA Schwartz, A Sebben, MV Sousa, W Fontes, MS Castro (2004) Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J* 23 (8):501-508

- 
- [23] A Siano, MV Humpola, E de Oliveira, F Albericio (2018) Leptodactylus latrans Amphibian Skin Secretions as a Novel Source for the Isolation of Antibacterial Peptides. *23* (11):2943-2957
- [24] M Zasloff (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (15):5449-5453
- [25] E Soravia, G Martini, M Zasloff (1988) Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett* 228 (2):337-340
- [26] J Patocka, E Nepovimova, B Klimova, Q Wu, K Kuca (2018) Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem.* 26 (32): 5924-5946
- [27] A Mor, M Amiche, P Nicolas (1994) Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry* 33 (21):6642-6650
- [28] M Amiche, AA Seon, H Wroblewski, P Nicolas (2000) Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *Eur J Biochem* 267 (14):4583-4592
- [29] A Siano, MV Humpola, E de Oliveira, F Albericio, AC Simonetta, R Lajmanovich, GG Tonarelli (2014) Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J Nat Prod* 77 (4):831-841
- [30] M Simmaco, G Kreil, D Barra (2009) Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (8):1551-1555
- [31] M Simmaco, G Mignogna, S Canofeni, R Miele, ML Mangoni, D Barra (1996) Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem* 242 (3):788-792
- [32] E Urbán, E Nagy, T Pál, A Sonnevend, JM Conlon (2007) Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 29 (3):317-321
- [33] B Yasin, M Pang, JS Turner, Y Cho, NN Dinh, AJ Waring, RI Lehrer, EA Wagar (2000) Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19 (3):187-194

- [34] VG Chinchar, J Wang, G Murti, C Carey, L Rollins-Smith (2001) Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology* 288 (2):351-357
- [35] R Lai, YT Zheng, J Shen, G Liu, H Liu, W-H Lee, S Tang, Y Zhang (2002) Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides* 23 :427-435
- [36] Y Zhao, Y Jin, J-H Wang, R-R Wang, L-M Yang, W-H Lee, Y-T Zheng, Y Zhang (2005) A novel heme-containing protein with anti-HIV-1 activity from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicon* 46 (6):619-624
- [37] J Bradbury (2005) Frog skin hope for HIV prevention. *Drug Discov Today* 10 (22):1489-1490
- [38] M Liberio, G Joanitti, R Azevedo, E Cilli, L Zanotta, A Nascimento, M Valle de Sousa, O Pires Júnior, W Fontes, M S. Castro (2009) Anti-Proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino acids* 40 :51-59
- [39] JM Conlon, YHA Abdel-Wahab, PR Flatt, J Leprince, H Vaudry, T Jouenne, E Condamine (2009) A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). *Peptides* 30 (5):888-892
- [40] H Yang, X Wang, X Liu, J Wu, C Liu, W Gong, Z Zhao, J Hong, D Lin, Y Wang, R Lai (2009) Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Mol Cell Proteomics* 8 (3):571-583
- [41] L Marenah, S McClean, PR Flatt, DF Orr, C Shaw, YH Abdel-Wahab (2004) Novel insulin-releasing peptides in the skin of *Phyllomedusa trinitatis* frog include 28 amino acid peptide from dermaseptin BIV precursor. *Pancreas* 29 (2):110-115
- [42] L Marenah, C Shaw, DF Orr, S McClean, PR Flatt, YH Abdel-Wahab (2004) Isolation and characterisation of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog *Agalychnis litodryas*. *Regul Pept* 120 (1-3):33-38
- [43] I Sanchis, R Spinelli, N Aschemacher, MV Humpola, A Siano (2020) Acetylcholinesterase inhibitory activity of a naturally occurring peptide isolated from *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) and its analogs. *Amino Acids* 52 (3):387-396



- 
- [44] YH Abdel-Wahab, L Marenah, DF Orr, C Shaw, PR Flatt (2005) Isolation and structural characterisation of a novel 13-amino acid insulin-releasing peptide from the skin secretion of *Agalychnis calcarifer*. *Biol Chem* 386 (6):581-587
- [45] YH Abdel-Wahab, GJ Power, MT Ng, PR Flatt, JM Conlon (2008) Insulin-releasing properties of the frog skin peptide pseudin-2 and its [Lys18]-substituted analogue. *Biol Chem* 389 (2):143-148
- [46] H van Zoggel, G Carpentier, C Dos Santos, Y Hamma-Kourbali, J Courty, M Amiche, J Delbé (2012) Antitumor and angiostatic activities of the antimicrobial peptide dermaseptin B2. *PLoS One* 7 (9):e44351
- [47] PC Montecucchi, R De Castiglione, S Piani, L Gozzini, V Erspamer (1981) Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int. J. Pept. Protein Res.* 17 (3):275-283
- [48] AL Salmon, LJ Cross, AE Irvine, TR Lappin, M Dathe, G Krause, P Canning, L Thim, M Beyermann, S Rothmund, M Bienert, C Shaw (2001) Peptide leucine arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin of the Northern Leopard frog, *Rana pipiens*. *J Biol Chem* 276 (13):10145-10152
- [49] C Graham, AE Irvine, S McClean, SC Richter, PR Flatt, C Shaw (2005) Peptide Tyrosine Arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin secretions of the dusky gopher frog, *Rana sevosia*. *Peptides* 26 (5):737-743
- [50] T Isaacson, A Soto, S Iwamuro, FC Knoop, JM Conlon (2002) Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides* 23 (3):419-425
- [51] D Srinivasan, M Mechkarska, YHA Abdel-Wahab, PR Flatt, JM Conlon (2013) Caerulein precursor fragment (CPF) peptides from the skin secretions of *Xenopus laevis* and *Silurana epittropicalis* are potent insulin-releasing agents. *Biochimie* 95 (2):429-435
- [52] OO Ojo, YH Abdel-Wahab, PR Flatt, JM Conlon (2013) Insulinotropic actions of the frog skin host-defense peptide alyteserin-2a: a structure-activity study. *Chem Biol Drug Des* 82 (2):196-204

- 
- [53] TF Spande, HM Garraffo, MW Edwards, HJC Yeh, L Pannell, JW Daly (1992) Epibatidine: a novel (chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadoran poison frog. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (9):3475-3478
- [54] Y Shimizu, E Inoue, C Ito (2004) Effect of the water-soluble and non-dialyzable fraction isolated from Senso (Chan Su) on lymphocyte proliferation and natural killer activity in C3H mice. *Biol Pharm Bull* 27 (2):256-260
- [55] D Manika, CD Subir, G Antony (1998) Toad (*Bufo melanostictus*, schneider) skin extract induced haematological and biochemical changes in rodents. *Indian J Pharmacol.* 30 :68-72
- [56] D Manika, S Dasgupta, A Gomes (1998) Immunomodulatory and antineoplastic activity of common Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract. *Indian J Pharmacol.* 30 :311-317
- [57] Q Changgeng, L Tongchuan, TY Shen, L Libertine-Garahan, J Eckman, T Biftu, S Ip (1993) Epibatidine is a nicotinic analgesic. *Eur J Pharmacol.* 250 (3):R13-R4
- [58] B Badio, JW Daly (1994) Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol Pharmacol* 45 (4):563-569
- [59] J Doyle, LE Llewellyn, CS Brinkworth, JH Bowie, KL Wegener, T Rozek, PA Wabnitz, JC Wallace, MJ Tyler (2002) Amphibian peptides that inhibit neuronal nitric oxide synthase. Isolation of lesuerin from the skin secretion of the Australian Stony Creek frog *Litoria lesueuri*. *Eur J Biochem* 269 (1):100-109
- [60] EA Barbosa, A Oliveira, A Plácido, R Socodato, CC Portugal, AC Mafud, AS Ombredane, DC Moreira, N Vale, LJ Bessa, GA Joanitti, C Alves, P Gomes, C Delerue-Matos, YP Mascarenhas, MM Marani, JB Relvas, M Pintado, J Leite (2018) Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. *Free Radic Biol Med* 115 :68-79
- [61] A Siano, FF Garibotto, SA Andujar, HA Baldoni, GG Tonarelli, RD Enriz (2017) Molecular design and synthesis of novel peptides from amphibians skin acting as inhibitors of cholinesterase enzymes. *J Pept Sci* 23 (3):236-244
- [62] A Siano, P I. Gatti, M S. Imaz, E Zerbini, A Simonetta, R Lajmanovich, G Tonarelli (2014) A Comparative Study of the Biological Activity of Skin and Granular Gland Secretions of *Leptodactylus latrans* and *Hypsiboas pulchellus* from Argentina. *Rec. Nat Prod* 8 :128-135

- [63] E Lodato (2013) Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation", En: Update on the 2004 Background Paper, (Ed: E Lodato), World Health Organization, p. 1-122
- [64] World Health Organization (2012) Dementia: a public health priority. [https://www.who.int/mental\\_health/publications/dementia\\_report\\_2012/en/](https://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/). Acceso: 10 de octubre del 2020
- [65] World Health Organization (2019) Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acceso: 30 de octubre del 2020.
- [66] J Bhatt, A Comas Herrera, F Amico, N Farina, J Wong, J Orange, S Gaber, M Knapp, M Salcher-Konrad, M Stevens, D Australia, W Grosvenor, D Ndetei, S Baker, B Heuchemer, J Oetzel, S Banerjee, J Hill, D Oliveira, P Wattana (2019) Expert essays, En: The World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. (Ed: S Evans-Lacko), Alzheimer's Disease International, p. 88-106
- [67] I Yaneva, V Balabanski, E Grigorov (2018) Alzheimer's disease: risk factors, ethiology, pathogenesis, diagnosis, clinical manifestation. *BJPH* 10 (2):47-59
- [68] L Blaikie, G Kay, P Kong Thoo Lin (2019) Current and emerging therapeutic targets of alzheimer's disease for the design of multi-target directed ligands. *MedChemComm* 10 (12):2052-2072
- [69] L Jalili-Baleh, E Babaei, S Abdpour, S Nasir Abbas Bukhari, A Foroumadi, A Ramazani, M Sharifzadeh, M Abdollahi, M Khoobi (2018) A review on flavonoid-based scaffolds as multi-target-directed ligands (MTDLs) for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 152 :570-589
- [70] AKL Liu, EJ Lim, I Ahmed, RCC Chang, RKB Pearce, SM Gentleman (2018) Review: Revisiting the human cholinergic nucleus of the diagonal band of Broca. *NeuroPath App Neuro.* 44 (7):647-662
- [71] J Ren, C Qin, F Hu, J Tan, L Qiu, S Zhao, G Feng, M Luo (2011) Habenula "Cholinergic" Neurons Corelease Glutamate and Acetylcholine and Activate Postsynaptic Neurons via Distinct Transmission Modes. *Neuron* 69 (3):445-452
- [72] J von Engelhardt, M Eliava, AH Meyer, A Rozov, H Monyer (2007) Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *J Neurosci* 27 (21):5633-5642

- [73] MR Picciotto, MJ Higley, YS Mineur (2012) Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76 (1):116-129
- [74] R Bartus, R Dean, B Beer, A Lippa (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217 (4558):408-414
- [75] JA Dumas, PA Newhouse (2011) The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (2):254-261
- [76] RT Bartus (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163 (2):495-529
- [77] K Tsim, H Soreq (2013) Acetylcholinesterase: old questions and new developments. *Front. Mol. Neurosci.* 5 :101-103
- [78] FJ Carvajal, NC Inestrosa (2011) Interactions of AChE with A $\beta$  Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front. Mol. Neurosci.* 4 19-29
- [79] GD Stanciu, A Luca, RN Rusu, V Bild, SI Beschea Chiriac, C Solcan, W Bild, DC Ababei (2019) Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules* 10 (1):40-61
- [80] O Lockridge (2015) Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther* 148 :34-46
- [81] J Shenouda, P Green, L Sultatos (2009) An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. *Toxicol Appl Pharmacol.* 241 (2):135-142
- [82] G Mushtaq, NH Greig, JA Khan, MA Kamal (2014) Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13 (8):1432-1439
- [83] JL Sussman, M Harel, F Frolow, C Oefner, A Goldman, L Toker, I Silman (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253 (5022):872-879

- [84] Y Nicolet, O Lockridge, P Masson, JC Fontecilla-Camps, F Nachon (2003) Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* 278 (42):41141-41147
- [85] M Bajda, A Więckowska, M Hebda, N Guzior, CA Sottriffer, B Malawska (2013) Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int J Mol Sci* 14 (3):5608-5632
- [86] P Masson, P Legrand, CF Bartels, MT Froment, LM Schopfer, O Lockridge (1997) Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* 36 (8):2266-2277
- [87] F Nachon, L Ehret-Sabatier, D Loew, C Colas, A van Dorsselaer, M Goeldner (1998) Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF. *Biochemistry* 37 (29):10507-10513
- [88] Y Xu, J-P Colletier, M Weik, H Jiang, J Moulton, I Silman, JL Sussman (2008) Flexibility of aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase: X-ray versus molecular dynamics. *Biophys. J.* 95 (5):2500-2511
- [89] G Johnson, SW Moore (2006) The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des* 12 (2):217-225
- [90] DJ Conrado, S Duvvuri, H Geerts, J Burton, C Biesdorf, M Ahamadi, S Macha, G Hather, J Francisco Morales, J Podichetty, T Nicholas, D Stephenson, M Trame, K Romero, B Corrigan (2020) Challenges in Alzheimer's Disease Drug Discovery and Development: The Role of Modeling, Simulation, and Open Data. *Clin Pharmacol Ther* 107 (4):796-805
- [91] Z Cai (2014) Monoamine oxidase inhibitors: promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Mol Med Rep* 9 (5):1533-1541
- [92] DL Dunleavy (1973) Mood and sleep changes with monoamine-oxidase inhibitors. *Proc R Soc Med.* 66 (9):951-951
- [93] F Shabbir, A Patel, C Mattison, S Bose, R Krishnamohan, E Sweeney, S Sandhu, W Nel, A Rais, R Sandhu, N Ngu, S Sharma (2013) Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression. *Neurochem Int* 62 (3):324-329

- [94] KR Merikangas, JR Merikangas (1995) Combination monoamine oxidase inhibitor and beta-blocker treatment of migraine, with anxiety and depression. *Biol Psychiatry* 38 (9):603-610
- [95] JA Samson, RJ Gurrera, L Nisenson, JJ Schildkraut (1995) Platelet monoamine oxidase activity and deficit syndrome schizophrenia. *Psychiatry Res* 56 (1):25-31
- [96] G Nedic, N Pivac, DK Hercigonja, M Jovancevic, KD Curkovic, D Muck-Seler (2010) Platelet monoamine oxidase activity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* 175 (3):252-255
- [97] M Marziniak, R Mössner, J Benninghoff, YV Syagailo, KP Lesch, C Sommer (2004) Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism in migraine. *J Neural Transm* 111 (5):603-609
- [98] MB Youdim, M Fridkin, H Zheng (2004) Novel bifunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neural Transm* 111 (10-11):1455-1471
- [99] L De Colibus, M Li, C Binda, A Lustig, DE Edmondson, A Mattevi (2005) Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (36):12684-12689
- [100] L Orelund, CG Gottfries (1986) Brain and brain monoamine oxidase in aging and in dementia of Alzheimer's type. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10 (3-5):533-540
- [101] L Emilsson, P Saetre, J Balciuniene, A Castensson, N Cairns, EE Jazin (2002) Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 326 (1):56-60
- [102] R Grailhe, A Cardona, N Even, I Seif, JP Changeux, I Cloëz-Tayarani (2009) Regional changes in the cholinergic system in mice lacking monoamine oxidase A. *Brain Res Bull* 78 (6):283-289
- [103] L Huang, C Lu, Y Sun, F Mao, Z Luo, T Su, H Jiang, W Shan, X Li (2012) Multitarget-directed benzylideneindanone derivatives: anti- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) aggregation, antioxidant, metal chelation, and monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition properties against Alzheimer's disease. *J Med Chem* 55 (19):8483-8492

- 
- [104] H Zheng, M Fridkin, MB Youdim (2012) From antioxidant chelators to site-activated multi-target chelators targeting hypoxia inducing factor, beta-amyloid, acetylcholinesterase and monoamine oxidase A/B. *Mini Rev Med Chem* 12 (5):364-370
- [105] SD Sivasubramaniam, CC Finch, MJ Rodriguez, N Mahy, EE Billett (2003) A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res* 313 (3):291-300
- [106] I Miklya (2016) The significance of selegiline/(-)-deprenyl after 50 years in research and therapy (1965-2015). *Mol Psychiatry* 21 (11):1499-1503
- [107] R Breinbauer (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (40):6445-64450
- [108] WR Markesbery (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23 (1):134-147
- [109] PH Evans (1993) Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49 (3):577-587
- [110] BS Berlett, ER Stadtman (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272 (33):20313-20316
- [111] JP Teixeira, AA de Castro, FV Soares, EFF da Cunha, TC Ramalho (2019) Future Therapeutic Perspectives into the Alzheimer's Disease Targeting the Oxidative Stress Hypothesis. *Molecules* 24 (23):4410-4415
- [112] H-T Liu, S-B Cheng, Y-C Huang, Y-T Huang, P-T Lin (2017) Coenzyme Q10 and Oxidative Stress: Inflammation Status in Hepatocellular Carcinoma Patients after Surgery. *Nutrients* 9 (1):29-33
- [113] J-L Liu, Y-G Fan, Z-S Yang, Z-Y Wang, C Guo (2018) Iron and Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Front. Mol. Neurosci.* 12 :632-646
- [114] AI Bush (2003) The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 26 (4):207-214
- [115] A Saiga, S Tanabe, T Nishimura (2003) Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51 (12):3661-3667

- [116] J Faivovich, C Haddad, P Garcia, D Frost, J Campbell, WC Wheeler (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist* 294 :1-229
- [117] R Ghirardi, JA Lopez (2014) Identificación de los anfibios santafesino, En: Anfibios de Santa fe, (Ed: R Ghirardi, JA Lopez), Universidad Nacional del Litoral, p.73-180
- [118] A Kwet, E Lavilla, J Faivovich, J Langone (2004) *Pseudis minuta*. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T.55903A11385301.en>. Acceso: 26 de octubre del 2020.
- [119] D Frost, T Grant, J Faivovich, RH Bain, A Haas, CFB Haddad, R Sá, A Channing, M Wilkinson, S Donnellan, BL Blotto (2006) The Amphibian Tree of Life. *Bull Am Mus Nat Hist* 297 :1-291
- [120] T Gomes dos Santos, SZ Cechin (2008) Amphibia, Anura, Leptodactylidae, *Leptodactylus chaquensis*: Distribution extension in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Check List* 4(2): 142–144
- [121] C Munoz-Camargo, MC Mendez, V Salazar, J Moscoso, D Narvaez, MM Torres, FK Florez, H Groot, E Mitrani (2016) Frog skin cultures secrete anti-yellow fever compounds. *J Antibiot* 69 (11):783-790
- [122] KA Johnson, RS Goody (2011) The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* 50 (39):8264-8269
- [123] H Bisswanger (2017) Enzyme Inhibition and Related Mechanisms, En: Enzyme Kinetics: Principles and Methods, Third, enlarged and improved Edition, (Ed: H Bisswanger). Wiley-VCH, p.87-119
- [124] H Bisswanger. (2017) Enzyme Inhibition and Related Mechanisms, En: Enzyme Kinetics, (Ed: H Bisswanger). Wiley-VCH, p. 87-119
- [125] MB Colović, DZ Krstić, TD Lazarević-Pašti, AM Bondžić, VM Vasić (2013) Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 11 (3):315-335
- [126] K Zhang, K Banerjee (2020) A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins* 12 (9):539-544



- 
- [127] OE Petrova, K Sauer (2017) High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP. *Methods Mol Biol.* 1657 :33-43
- [128] SM D'Addio, JR Bothe, C Neri, PL Walsh, J Zhang, E Pierson, Y Mao, M Gindy, A Leone, AC Templeton (2016) New and Evolving Techniques for the Characterization of Peptide Therapeutics. *J Pharm. Sci.* 105 (10):2989-3006
- [129] S Dewanjee, M Gangopadhyay, N Bhattacharya, R Khanra, TK Dua (2015) Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *J Pharm. Anal.* 5 (2):75-84
- [130] IM Choma, EM Grzelak (2011) Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* 1218 (19):2684-2691
- [131] IA Ramallo, MO Salazar, RL Furlan (2015) Thin Layer Chromatography-Autography-High Resolution Mass Spectrometry Analysis: Accelerating the Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Phytochem Anal* 26 (6):404-412
- [132] P García, RL Furlan (2015) Multiresponse Optimisation Applied to the Development of a TLC Autography for the Detection of Tyrosinase Inhibitors. *Phytochem Anal* 26 (4):287-292
- [133] MO Salazar, RL Furlan (2007) A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochem Anal* 18 (3):209-212
- [134] JB Fenn, M Mann, CK Meng, SF Wong, CM Whitehouse (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (4926):64-71
- [135] K Tanaka, H Waki, Y Ido, S Akita, Y Yoshida, T Yoshida, T Matsuo (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2 (8):151-153
- [136] R Erra-Balsells (2004) Del Vuelo de las Proteínas y de como lograrlo (Espectrometría de masa UV-MALDI). *Química Viva* 2 (3):56-69
- [137] P Favreau, L Menin, S Michalet, F Perret, O Cheneval, M Stocklin, P Bulet, R Stocklin (2006) Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* 47 (6):676-687

- 
- [138] RJ Cotter (1997) Time-of-Flight Mass Spectrometry, En: Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications, (Ed: RB Cole), John Wiley & Sons, p.345-364
- [139] GA Valaskovic, NL Kelleher, DP Little, DJ Aaserud, FW McLafferty (1995) Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal Chem* 67 (20):3802-3805
- [140] TC Dingle, SM Butler-Wu (2013) MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clin. Lab. Med.* 33 (3):589-609
- [141] American Society of Ichthyologists and Herpetologists (2004) Euthanasia, En: Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research, american society of ichthyologists and herpetologists. (Ed: SJ Beaupre), American Society of Ichthyologists and Herpetologists, p.1-43
- [142] DJ McCaldin (1960) The Chemistry of Ninhydrin. *Chem Rev.* 60 (1):39-51
- [143] H Thies, FW Reuther (1957) Behavior of alkaloids toward various solvent mixtures in paper chromatography. *Arzneimittelforschung* 7 (1):63-65
- [144] H Schagger (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1 (1):16-22
- [145] H Blum, H Beier, H J. Gross (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2):93-99
- [146] PK Smith, RI Krohn, GT Hermanson, AK Mallia, FH Gartner, MD Provenzano, EK Fujimoto, NM Goeke, BJ Olson, DC Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1):76-85
- [147] GL Ellman, KD Courtney, V Andres, RM Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7 (2):88-95
- [148] E Méndez-Álvarez, R Soto-Otero, I Sánchez-Sellero, ML-R Lamas (1997) Inhibition of brain monoamine oxidase by adducts of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline with components of cigarette smoke. *Life Sci* 60 (19):1719-1727
- [149] M Memarpoor-Yazdi, H Mahaki, H Zare-Zardini (2013) Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *J. Funct. Foods* 5 (1):62-70

- 
- [150] K Bilska, N Wojciechowska, S Alipour, EM Kalemba (2019) Ascorbic Acid-The Little-Known Antioxidant in Woody Plants. *Antioxidants* 8 (12):645-655
- [151] R He, X Ju, J Yuan, L Wang, AT Girgih, RE Aluko (2012) Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Res. Int.* 49 (1):432-438
- [152] A Siano, MV Humpola, MC Rey, A Simonetta, GG Tonarelli (2011) Interaction of acylated and substituted antimicrobial peptide analogs with phospholipid-polydiacetylene vesicles. Correlation with their biological properties. *Chem Biol Drug Des* 78 (1):85-93
- [153] RDC Team: (2010) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: ; R Foundation for Statistical Computing
- [154] NA Clark, M Hafner, M Kouril, EH Williams, JL Muhlich, M Pilarczyk, M Niepel, PK Sorger, M Medvedovic (2017) GRcalculator: an online tool for calculating and mining dose-response data. *BMC Cancer* 17 (1):698
- [155] RC Gentleman, VJ Carey, DM Bates, B Bolstad, M Dettling, S Dudoit, B Ellis, L Gautier, Y Ge, J Gentry, K Hornik, T Hothorn, W Huber, S Iacus, R Irizarry, F Leisch, C Li, M Maechler, AJ Rossini, G Sawitzki, C Smith, G Smyth, L Tierney, JY Yang, J Zhang (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5 (10):R80-R95
- [156] H Wickham (2016) Build a plot layer by layer, En: ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, (Ed: H Wickham), Springer-Verlag, p.41-64
- [157] IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org>. Acceso: 30 de octubre del 2020
- [158] L Huang, J Li, H Anboukaria, Z Luo, M Zhao, H Wu (2016) Comparative transcriptome analyses of seven anurans reveal functions and adaptations of amphibian skin. *Sci Rep* 6 :24069-24072
- [159] NM Resnick, WL Maloy, HR Guy, M Zasloff (1991) A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure. *Cell* 66 (3):541-54
- [160] M Baraquet, P Grenat, N Salas, A Martino (2014) Geographic variation in the advertisement call of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *acta ethologica* 18 :1-18

- [161] M Baraquet, P Grenat, N Salas, A Martino (2012) Variación morfométrica y geográfica entre poblaciones de *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) en Argentina. *UNED Res. J.* 4(2), 147-155
- [162] JM Ferro, DE Cardozo, P Suárez, JM Boeris, A Blasco-Zúñiga, G Barbero, A Gomes, T Gazoni, W Costa, CY Nagamachi, M Rivera, PP Parise-Maltempi, JE Wiley, JC Pieczarka, CFB Haddad, J Faivovich, D Baldo (2018) Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *PloS one* 13 (2):e0192861
- [163] R Spinelli, LA Barrero Guevara, JA López, CM Camargo, H Groot de Restrepo, AS Siano (2020) Cytotoxic and antiproliferative activities of amphibian (anuran) skin extracts on human acute monocytic leukemia cells. *Toxicon* 177 :25-34
- [164] A Silver (1974) Pseudocholinesterases, En: The biology of cholinesterases, (Ed: A Silver), *Frontiers of Biology*, p-426–447
- [165] IK Rhee, M van de Meent, K Ingkaninan, R Verpoorte (2001) Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A* 915 (1-2):217-223
- [166] IA Ramallo, MO Salazar, RLE Furlan (2020) Enzymatic Bioautographic Methods. *Methods Mol Biol* 2089 :179-189
- [167] A Marston, J Kissling, K Hostettmann (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Anal* 13 (1):51-54
- [168] E Giacobini (2004) Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res* 50 (4):433-440
- [169] B Legerská, D Chmelová, M Ondrejovič, S Miertuš (2020) The TLC-Bioautography as a Tool for Rapid Enzyme Inhibitors detection - A Review. *Crit Rev Anal Chem* 1-19
- [170] SL Han, XX Li, QH Mian, W Lan, Y Liu (2013) Comparison of antioxidant activity between two species of chamomiles produced in Xinjiang by TLC-bioautography. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 38 (2):193-198
- [171] Q Favre-Godal, EF Queiroz, JL Wolfender (2013) Latest developments in assessing antifungal activity using TLC-bioautography: a review. *J AOAC Int* 96 (6):1175-1188

- [172] P García, IA Ramallo, MO Salazar, RLE Furlan (2016) Chemical diversification of essential oils, evaluation of complex mixtures and identification of a xanthine oxidase inhibitor. *RSC Advances* 6 (62):57245-57252
- [173] RJ Ritchie, T Prvan (1996) Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics. *Biochem Ed.* 24 (4):196-206
- [174] NA El-Sayed, AE Farag, MAF Ezzat, H Akincioglu, İ Gülçin, SM Abou-Seri (2019) Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation of novel pyrrolizine-based compounds with potential activity as cholinesterase inhibitors and anti-Alzheimer's agents. *Bioorg Chem* 93 :103312-103322
- [175] J Mo, H Yang, T Chen, Q Li, H Lin, F Feng, W Liu, W Qu, Q Guo, H Chi, Y Chen, H Sun (2019) Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of quinoline-ferulic acid hybrids as cholinesterase inhibitors. *Bioorg Chem* 93 :103310-103311
- [176] S Onder, K Biberoglu, O Tacal (2019) The kinetics of inhibition of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by methylene violet 3RAX. *Chem Biol Interact* 314 :108845-108851
- [177] G Mohan, S Gupta. (2017) QSAR Models towards Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease, En: *Oncology: Breakthroughs in Research and Practice*, (Ed: G Mohan, S Gupta), Information Resources Management Association, p.591-636
- [178] WD Mallender, T Szegletes, TL Rosenberry (2000) Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry* 39 (26):7753-7763
- [179] Z Radic, E Reiner, P Taylor (1991) Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol* 39 (1):98-104
- [180] NC Inestrosa, A Alvarez, CA Perez, RD Moreno, M Vicente, C Linker, OI Casanueva, C Soto, J Garrido (1996) Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16 (4):881-891
- [181] LC Camargo, GAA Campos, P Galante, AM Biolchi, JC Goncalves, KS Lopes, MR Mortari (2018) Peptides isolated from animal venom as a platform for new therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 67 :79-86

- 
- [182] D Rodriguez-Ithurralde, R Silveira, L Barbeito, F Dajas (1983) Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Neurochem Int* 5 (3):267-274
- [183] Z Radic, R Duran, DC Vellom, Y Li, C Cervenansky, P Taylor (1994) Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 269 (15):11233-11239
- [184] D Knez, M Sova, U Košak, S Gobec (2017) Dual inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases for Alzheimer's disease. *Future Med Chem* 9 (8):811-832
- [185] MS Uddin, MT Kabir, MM Rahman, B Mathew (2020) TV 3326 for Alzheimer's dementia: a novel multimodal ChE and MAO inhibitors to mitigate Alzheimer's-like neuropathology. *J Pharm Pharmacol.* 72 (8):1001-1012
- [186] MBH Youdim (2013) Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and m30 derived from rasagiline. *Exp. Neurobiol.* 22 (1):1-10
- [187] S Carradori, M D'Ascenzio, P Chimenti, D Secci, A Bolasco (2014) Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products. *Mol Divers* 18 (1):219-243
- [188] D van Diermen, A Marston, J Bravo, M Reist, PA Carrupt, K Hostettmann (2009) Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. *J Ethnopharmacol* 122 (2):397-401
- [189] EA Mazzio, N Harris, KF Soliman (1998) Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. *Planta Med* 64 (7):603-606
- [190] M Rajput (2010) Natural Monoamine oxidase inhibitors: A Review. *J. Pharm. Res.* 3 (3):482-485
- [191] J Meena, R Ojha, AV Muruganandam, S Krishnamurthy (2011) *Asparagus racemosus* competitively inhibits in vitro the acetylcholine and monoamine metabolizing enzymes. *Neurosci Lett* 503 (1):6-9
- [192] G Ucar, C Tas, A Tumer (2005) Monoamine oxidase inhibitory activities of the scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) venom peptides. *Toxicon* 45 (1):43-52
- [193] C Passos, C Simões-Pires, A Henriques, M Cuendet, P A. Carrupt, P Christen (2014) Alkaloids as Inhibitors of Monoamine Oxidases and Their Role in the Central Nervous System. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 43 :123-144.

- [194] IE Orhan, HO Gulcan (2015) Coumarins: Auspicious Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibitors. *Curr Top Med Chem* 15 (17):1673-1682
- [195] F Larit, KM Elokely, ND Chaurasiya, S Benyahia, MA Nael, F Leon, MS Abu-Darwish, T Efferth, YH Wang, D Belouahem-Abed, S Benayache, BL Tekwani, SJ Cutler (2018) Inhibition of human monoamine oxidase A and B by flavonoids isolated from two Algerian medicinal plants. *Phytomedicine* 40 :27-36
- [196] w huang, w wei, z Shen (2014) Drug-Like Chelating Agents: A Potential Lead for Alzheimer's Disease. *RSC Adv.* 4 (94): 1-12
- [197] MS Blois (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181 (4617):1199-200
- [198] SB Kedare, RP Singh (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *JFST* 48 (4):412-422
- [199] J Tian, Y Liu, K Chen (2017) Ginkgo biloba Extract in Vascular Protection: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Curr Vasc Pharmacol* 15 (6):532-548
- [200] G Yang, Y Wang, J Sun, K Zhang, J Liu (2016) Ginkgo Biloba for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Curr Top Med Chem* 16 (5):520-528
- [201] LL Mensor, FS Menezes, GG Leitão, AS Reis, TC dos Santos, CS Coube, SG Leitão (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15 (2):127-130
- [202] X Wang, S Ren, C Guo, W Zhang, X Zhang, B Zhang, S Li, J Ren, Y Hu, H Wang (2017) Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species. *Acta Biochim Biophys Sin* 49 (6):550-559
- [203] N Rajapakse, E Mendis, W-K Jung, J-Y Je, S-K Kim (2005) Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int* 38 (2):175-182
- [204] E Mendis, N Rajapakse, HG Byun, SK Kim (2005) Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci* 77 (17):2166-2178
- [205] CN Amadi, SJ Offor, C Frazzoli, OE Orisakwe (2019) Natural antidotes and management of metal toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int.* 26 (18):18032-18052

- [206] R Skouta (2016) Neuroprotective effect of antioxidant compounds. *Neural Regen. Res.* 11 (4):566-567
- [207] G Özbolat, Y A (2019) In vitro effects of iron chelation of curcumin Fe (III) complex. *Cukurova Med J* 44 (3):947-952
- [208] L Reznichenko, T Amit, H Zheng, Y Avramovich-Tirosh, MB Youdim, O Weinreb, S Mandel (2006) Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 97 (2):527-536
- [209] HC Hatcher, RN Singh, FM Torti, SV Torti (2009) Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Fut Med Chem* 1 (9):1643-1670
- [210] ME Walters, R Esfandi, A Tsopmo (2018) Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods.* 7 (10):172-189
- [211] Z Li, A Jiang, T Yue, J Wang, Y Wang, J Su (2013) Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science* 96 (7):4242-4251
- [212] R Slizyte, K Rommi, R Mozuraityte, P Eck, K Five, T Rustad (2016) Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnol Rep* 11 :99-109
- [213] J Carrasco-Castilla, AJ Hernández-Álvarez, C Jiménez-Martínez, C Jacinto-Hernández, M Alaiz, J Girón-Calle, J Vioque, G Dávila-Ortiz (2012) Antioxidant and metal chelating activities of Phaseolus vulgaris L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chem.* 131 (4):1157-1164
- [214] MS Castro, TC Ferreira, EM Cilli, E Crusca, Jr., MJ Mendes-Giannini, A Sebben, CA Ricart, MV Sousa, W Fontes (2009) Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides* 30 (2):291-296
- [215] JM Sciani, PL de-Sá-Júnior, AK Ferreira, A Pereira, MM Antoniazzi, C Jared, DC Pimenta (2013) Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. *Biomed. Prev. Nutr.* 3 (1):10-18



- 
- [216] LD Rash, RA Morales, S Vink, PF Alewood (2011) De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). *Toxicon* 57 (2):208-216
- [217] CL Bevins, M Zasloff (1990) Peptides from frog skin. *Annu Rev Biochem* 59 395-414
- [218] N Pierre, L Ali (2013) Dermaseptins. *Handbook of Biologically Active Peptides* 350-363
- [219] WM Nadler, D Waidelich, A Kerner, S Hanke, R Berg, A Trumpp, C Rösli (2017) MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. *J. Proteome Res.* 16 (3):1207-1215
- [220] RE March (2017) Ion Trap Mass Spectrometers, En: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, (Ed: JC Lindon, GE Tranter, D Koppenaal) Elsevier, p.330-337
- [221] E Kapp, F Schütz (1996) Overview of Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) Database Search Algorithms, En: Current protocols in protein science, (Ed: JE Coligan), John Wiley and Sons, p. 2521-25219
- [222] SK Swanson (2009) Generation and Analysis of Multidimensional Protein Identification Technology Datasets, En: Mass spectrometry of proteins and peptides : methods and protocols, (Ed: MS Lipton, L Pasa-Tolic), Springer protocols, p.1-20
- [223] DC Liebler (2002) Overview of Analytical Proteomics, En: Introduction to proteomics : tools for the new biology, (Ed: DC Liebler) Humana Press, p.27-29
- [224] C Delahunty, JR Yates, 3rd (2005) Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods* 35 (3):248-255
- [225] MM Savitski, F Kjeldsen, ML Nielsen, RA Zubarev (2007) Relative specificities of water and ammonia losses from backbone fragments in collision-activated dissociation. *J Proteome Res* 6 (7):2669-2673
- [226] MJ MacCoss (2005) Computational analysis of shotgun proteomics data. *Curr Opin Chem Biol* 9 (1):88-94
- [227] RS Johnson, MT Davis, JA Taylor, SD Patterson (2005) Informatics for protein identification by mass spectrometry. *Methods* 35 (3):223-236

- 
- [228] L-R Yu, NA Stewart, TD Veenstra. (2010) Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome, En: Essentials of Genomic and Personalized Medicine, (Ed: GS Ginsburg, HF Willard), San Diego: Academic Press, p.89-96
- [229] B Ma, K Zhang, C Hendrie, C Liang, M Li, A Doherty-Kirby, G Lajoie (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17 (20):2337-2342
- [230] AD Prjibelski, AI Korobeynikov, AL Lapidus. (2019) Sequence Analysis, En: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology, (Ed: S Ranganathan, M Gribskov, K Nakai, C Schönbach), Oxford: Academic Press, p.292-322
- [231] MO Dayhoff, RM Schwartz (1978) A model of evolutionary change in proteins. *Atlas of protein sequence and structure* 22 :345-352
- [232] C Kosiol, N Goldman (2005) Different versions of the Dayhoff rate matrix. *Mol Biol Evol* 22 (2):193-199
- [233] S Henikoff, JG Henikoff (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (22):10915-10919
- [234] S Karlin, SF Altschul (1990) Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (6):2264-2268
- [235] WF van Gunsteren, HJC Berendsen (1990) Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 29 (9):992-1023
- [236] KT Simons, C Strauss, D Baker (2001) Prospects for ab initio protein structural genomics1 1Edited by B. Honig. *Journal of Molecular Biology* 306 (5):1191-9
- [237] DT Jones (2001) Predicting novel protein folds by using FRAGFOLD. *Proteins* 5 (12):127-132
- [238] C Sander, R Schneider (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* 9 (1):56-68
- [239] TL Blundell, BL Sibanda, MJE Sternberg, JM Thornton (1987) Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 326 (6111):347-52
- [240] P Thévenet, Y Shen, J Maupetit, F Guyon, P Derreumaux, P Tufféry (2012) PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res* 40 (W1):W288-293

- [241] A Lamiable, P Thévenet, J Rey, M Vavrusa, P Derreumaux, P Tufféry (2016) PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res* 44 (W1):W449-W454
- [242] KY Chang, J-R Yang (2013) Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. *PloS one* 8 (8):e70166
- [243] A Sharma, D Singla, M Rashid, GPS Raghava (2014) Designing of peptides with desired half-life in intestine-like environment. *BMC Bioinformatics* 15 (1):282-290
- [244] G Wang, X Li, Z Wang (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 44 (D1):D1087-D1093
- [245] JM Conlon (2011) Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell Mol Life Sci* 68 (13):2303-2315
- [246] IP Gomes, TL Santos, AN de Souza, LO Nunes, GA Cardoso, CO Matos, LMF Costa, LM Lião, JM Resende, RM Verly (2020) Membrane interactions of the anuran antimicrobial peptide HSP1-NH(2): Different aspects of the association to anionic and zwitterionic biomimetic systems. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1863 (1):183449-183459
- [247] R Lai, H Liu, W Hui Lee, Y Zhang (2002) An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (4):796-799
- [248] W Dong, X Zhu, X Zhou, Y Yang, X Yan, L Sun, D Shang (2018) Potential role of a series of lysine-/leucine-rich antimicrobial peptide in inhibiting lipopolysaccharide-induced inflammation. *475 (22):3687-3706*
- [249] F Abbassi, B Oury, T Blasco, D Sereno, G Bolbach, P Nicolas, K Hani, M Amiche, A Ladram (2008) Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid *Pelophylax saharica*. *Peptides* 29 (9):1526-1533
- [250] JM Conlon, A Sonnevend, M Patel, C Davidson, PF Nielsen, T Pál, LA Rollins-Smith (2003) Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylei*. *J Pept Res* 62 (5):207-213
- [251] JM Conlon, J Kolodziejek, N Nowotny, J Leprince, H Vaudry, L Coquet, T Jouenne, S Iwamuro (2007) Cytolytic peptides belonging to the brevinin-1 and

- brevinin-2 families isolated from the skin of the Japanese brown frog, *Rana dybowskii*. *Toxicon* 50 (6):746-756
- [252] M Simmaco, G Mignogna, D Barra, F Bossa (1994) Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J Biol Chem* 269 (16):11956-11961
- [253] Z Yang, S He, J Wang (2019) Rational Design of Short Peptide Variants by Using Kunitzin-RE, an Amphibian-Derived Bioactivity Peptide, for Acquired Potent Broad-Spectrum Antimicrobial and Improved Therapeutic Potential of Commensalism Coinfection of Pathogens. *J Med Chem.* 62 (9):4586-4605
- [254] ML Mangoni, AC Rinaldi, A Di Giulio, G Mignogna, A Bozzi, D Barra, M Simmaco (2000) Structure–function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur J Biochem.* 267 (5):1447-1454
- [255] Y Bessin, N Saint, L Marri, D Marchini, G Molle (2004) Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. *Biomembranes* 1667 (2):148-156
- [256] GF Cespedes, EN Lorenzón, EF Vicente, MJ Mendes-Giannini, W Fontes, MS Castro, EM Cilli (2012) Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein Pept Lett* 19 (6):596-603
- [257] K Fosgerau, T Hoffmann (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today* 20 (1):122-128
- [258] JM Conlon, N Al-Ghaferi, B Abraham, A Sonnevend, L Coquet, J Leprince, T Jouenne, H Vaudry, S Iwamuro (2006) Antimicrobial peptides from the skin of the Tsushima brown frog *Rana tsushimensis*. *CBP* 143 (1):42-49
- [259] J Wu, H Liu, H Yang, H Yu, D You, Y Ma, H Ye, R Lai (2011) Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. *J Proteome Res* 10 (9):4230-4240
- [260] HX Wang, TB Ng (2005) An antifungal peptide from the coconut. *Peptides* 26 (12):2392-2396
- [261] X Lv, Y Lin, Y Jie, M Sun, B Zhang, F Bai, H Zhao, J Li (2018) Purification, characterization, and action mechanism of plantaricin DL3, a novel bacteriocin

- against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Lactobacillus plantarum* DL3 from Chinese Suan-Tsai. *Eur. Food Res. Technol.* 244 (2):323-331
- [262] D Ehmann, J Wendler, L Koeniger, IS Larsen, T Klag, J Berger, A Marette, M Schaller, EF Stange, NP Malek, BAH Jensen, J Wehkamp (2019) Paneth cell  $\alpha$ -defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (9):3746-3751
- [263] GM Eliopoulos, C Thauvin, B Gerson, RC Moellering, Jr. (1985) In vitro activity and mechanism of action of A21978C1, a novel cyclic lipopeptide antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 27 (3):357-362
- [264] E Chaparro, PIJ da Silva (2016) Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. *Int J Antimicrob Agents* 48 (3):277-285
- [265] VJ Smith, JMO Fernandes, SJ Jones, GD Kemp, MF Tatner (2000) Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 10 (3):243-260
- [266] BM Bishop, ML Juba, PS Russo, M Devine, SM Barksdale, S Scott, R Settlage, P Michalak, K Gupta, K Vliet, JM Schnur, ML van Hoek (2017) Discovery of Novel Antimicrobial Peptides from *Varanus komodoensis* (Komodo Dragon) by Large-Scale Analyses and De-Novo-Assisted Sequencing Using Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *J Proteome Res* 16 (4):1470-1482
- [267] X Yang, Y Wang, WH Lee, Y Zhang (2013) Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon* 74 :151-157
- [268] CE Meyer, F Reusser (1967) A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* 23 (2):85-86
- [269] A Asoodeh, HZ Zardini, J Chamani (2012) Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). *J Pept Sci* 18 (1):10-16
- [270] Y Zhang, S Liu, S Li, Y Cheng, L Nie, G Wang, C Lv, W Wei, C Cheng, F Hou, L Hao (2017) Novel short antimicrobial peptide isolated from *Xenopus laevis* skin. *J. Pep Sci.* 23 (5):403-409
- [271] T Rončević, L Krce, M Gerdol, S Pacor, M Benincasa, F Guida, I Aviani, V Čikeš-Čulić, A Pallavicini, A Maravić, A Tossi (2019) Membrane-active antimicrobial

- peptide identified in *Rana arvalis* by targeted DNA sequencing. *Biomembranes* 1861 (3):651-659
- [272] G Stoffels, J Nissen-Meyer, A Gudmundsdottir, K Sletten, H Holo, IF Nes (1992) Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (5):1417-1422
- [273] J Pei, Z Feng, T Ren, H Sun, H Han, W Jin, J Dang, Y Tao (2018) Purification, characterization and application of a novel antimicrobial peptide from *Andrias davidianus* blood. *Lett Appl Microbiol* 66 (1):38-43
- [274] SM Mandal, S Dey, M Mandal, S Sarkar, S Maria-Neto, OL Franco (2009) Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides* 30 (4):633-637
- [275] S Prabhu, S Dennison, R Lea, T Snape, F Harris (2014) Cn -AMP2 from green coconut water is an anionic anticancer peptide. *J. Pep. Sci.* 20 (12):909-915
- [276] Y Shigeri, A Yasuda, Y Hagihara, K Nishi, K Watanabe, T Imura, H Inagaki, Y Haramoto, Y Ito, M Asashima (2015) Identification of novel peptides from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin by direct tissue MALDI-MS analysis. *The FEBS Journal* 282 (1):102-113
- [277] F Hou, J Li, P Pan, J Xu, L Liu, W Liu, B Song, N Li, J Wan, H Gao (2011) Isolation and characterisation of a new antimicrobial peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *Int J Antimicrob Agents* 38 (6):510-515
- [278] JD King, M Mechkarska, L Coquet, J Leprince, T Jouenne, H Vaudry, K Takada, JM Conlon (2012) Host-defense peptides from skin secretions of the tetraploid frogs *Xenopus petersii* and *Xenopus pygmaeus*, and the octoploid frog *Xenopus lenduensis* (Pipidae). *Peptides* 33 (1):35-43
- [279] B Gao, P Sherman, L Luo, J Bowie, S Zhu (2009) Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. *Faseb j* 23 (4):1230-1245
- [280] BM Bishop, ML Juba, MC Devine, SM Barksdale, CA Rodriguez, MC Chung, PS Russo, KA Vliet, JM Schnur, ML van Hoek (2015) Bioprospecting the American alligator (*Alligator mississippiensis*) host defense peptidome. *PLoS One* 10 (2):e0117394

- 
- [281] H Du, J Yang, X Lu, Z Lu (2018) Purification, Characterization, and Mode of Action of Plantaricin GZ1-27, a Novel Bacteriocin against *Bacillus cereus*. *J Agric Food Chem*. 66 (18):4716-4724
- [282] J Pei, L Jiang (2017) Antimicrobial peptide from mucus of *Andrias davidianus*: screening and purification by magnetic cell membrane separation technique. *Int J Antimicrob Agents* 50 (1):41-46
- [283] D Robinette, S Wada, T Arroll, MG Levy, WL Miller, EJ Noga (1998) Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell Mol Life Sci* 54 (5):467-475
- [284] AH Thompson, AJ Bjourson, DF Orr, C Shaw, S McClean (2007) Amphibian skin secretomics: application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: discovery of a novel peptide family, the hyposins. *J Proteome Res* 6 (9):3604-3613
- [285] N Bhagavathula, V Meedidoddi, S Bourque, R Vimaladevi, S Kesavakurup, D Selvadurai, S Shrivastava, C Krishnappa (2017) Characterization of two novel antimicrobial peptides from the cuticular extracts of the ant *Trichomyrmex criniceps* (Mayr), (Hymenoptera: Formicidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 94 (4):1-8
- [286] T Sornwatana, S Roytrakul, N Wetprasit, S Ratanapo (2013) Brucin, an antibacterial peptide derived from fruit protein of *Fructus Bruceae*, *Bucea javanica* (L.) Merr. *Lett Appl Microbiol* 57 (2):129-136
- [287] F Albericio (2004) Developments in peptide and amide synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 8 (3):211-221
- [288] RR Burgess (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol* 463 :259-282
- [289] SB Kent (1988) Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* 57 :957-989
- [290] EC Johnson, SB Kent (2007) Towards the total chemical synthesis of integral membrane proteins: a general method for the synthesis of hydrophobic peptide-thioester building blocks. *Tetrahedron Lett* 48 (10):1795-1799

- [291] WC Chan, PD White (2000) Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach, (Ed: WC Chan, PD White), Oxford University Press, p.1-346
- [292] GB Fields, M Simon, JN Albelson (1997) Introduction to Peptide Synthesis , En: Solid-phase peptide synthesis, (Ed: GB Fields), Wiley, p. 161-214
- [293] GB Fields, RL Noble (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 35 (3):161-214
- [294] SA Kates, F Albericio (2000) Solid-phase synthesis, En: A practical guide, (Ed: SA Kates, F Albericio), Marcel Dekker, Inc, p.1-142
- [295] JP Overington, B Al-Lazikani, AL Hopkins (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5 (12):993-996
- [296] J Drews (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287 (5460):1960-1964
- [297] T Cheng, Q Li, Z Zhou, Y Wang, SH Bryant (2012) Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *The AAPS journal* 14 (1):133-141
- [298] PD Lyne (2002) Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov Today* 7 (20):1047-1055
- [299] GL Warren, CW Andrews, AM Capelli, B Clarke, J LaLonde, MH Lambert, M Lindvall, N Nevins, SF Semus, S Senger, G Tedesco, ID Wall, JM Woolven, CE Peishoff, MS Head (2006) A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem* 49 (20):5912-5931
- [300] T Yamashita, A Ueda, T Mitsui, A Tomonaga, S Matsumoto, T Kodama, H Fujitani (2014) Molecular Dynamics Simulation-Based Evaluation of the Binding Free Energies of Computationally Designed Drug Candidates: Importance of the Dynamical Effects. *Chem. Pharm. Bull.* 62 (7):661-667
- [301] T Yamashita, A Ueda, T Mitsui, A Tomonaga, S Matsumoto, T Kodama, H Fujitani (2015) The feasibility of an efficient drug design method with high-performance computers. *Chem Pharm Bull* 63 (3):147-155
- [302] X Liu, D Shi, S Zhou, H Liu, H Liu, X Yao (2018) Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 13 (1):23-37
- [303] P Sneha, CGP Doss (2016) Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 102 :181-224



- [304] S Hossain, A Kabedev, A Parrow, CAS Bergström, P Larsson (2019) Molecular simulation as a computational pharmaceuticals tool to predict drug solubility, solubilization processes and partitioning. *Eur J Pharm Biopharm* 137 :46-55
- [305] S Genheden, U Ryde (2015) The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov* 10 (5):449-461
- [306] A Petzer, BH Harvey, JP Petzer (2014) The interactions of azure B, a metabolite of methylene blue, with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 274 (3):488-493
- [307] M Hebda, M Bajda, A Więckowska, N Szałaj, A Pasięka, D Panek, J Godyń, T Wichur, D Knez, S Gobec, B Malawska (2016) Synthesis, Molecular Modelling and Biological Evaluation of Novel Heterodimeric, Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and Amyloid Beta. *Molecules* 21 (4):1-24
- [308] M Harel, GJ Kleywegt, RBG Ravelli, I Silman, JL Sussman (1995) Crystal structure of an acetylcholinesterase&#x2013;fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure* 3 (12):1355-1366
- [309] MN Ngamelue, K Homma, O Lockridge, OA Asojo (2007) Crystallization and X-ray structure of full-length recombinant human butyrylcholinesterase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 63 (Pt 9):723-727
- [310] GCP van Zundert, JPGLM Rodrigues, M Trellet, C Schmitz, PL Kastiris, E Karaca, ASJ Melquiond, M van Dijk, SJ de Vries, AMJJ Bonvin (2016) The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol Biol.* 428 (4):720-725
- [311] DA Case, IY Ben-Shalom, SR Brozell (2020) AMBER Software 2020. University of California, San Francisco.
- [312] JA Maier, C Martinez, K Kasavajhala, L Wickstrom, KE Hauser, C Simmerling (2015) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* 11 (8):3696-3713
- [313] RW Pastor, BR Brooks, A Szabo (1988) An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Molecular Physics* 65 (6):1409-1419
- [314] H Berendsen, JPM Postma, W van Gunsteren, AD DiNola, JR Haak (1984) Molecular-Dynamics with Coupling to An External Bath. *J. Chem. Phys.* 81 :3684-3692

- [315] AW Götz, MJ Williamson, D Xu, D Poole, S Le Grand, RC Walker (2012) Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *J. Chem. Theory Comput.* 8 (5):1542-1555
- [316] R Salomon-Ferrer, AW Götz, D Poole, S Le Grand, RC Walker (2013) Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J. Chem. Theory Comput.* 9 (9):3878-3888
- [317] S Miyamoto, PA Kollman (1992) Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* 13 (8):952-962
- [318] ON de Souza, RL Ornstein (1997) Effect of Warmup Protocol and Sampling Time on Convergence of Molecular Dynamics Simulations of a DNA Dodecamer Using AMBER 4.1 and Particle-Mesh Ewald Method. *J Biomol Struct Dyn.* 14 (5):607-611
- [319] M Paul, M Kumar Panda, H Thatoi (2019) Developing Hispolon-based novel anticancer therapeutics against human (NF- $\kappa$ B) using in silico approach of modelling, docking and protein dynamics. *J Biomol Struct Dyn.* 37 (15):3947-3967
- [320] V Tsui, DA Case (2000) Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 56 (4):275-291
- [321] V Zoete, MB Irving, O Michielin (2010) MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. *J Mol Recognit* 23 (2):142-152
- [322] JM Conlon, N Al-Ghaferi, B Abraham, J Leprince (2007) Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods* 42 (4):349-357
- [323] G Kreil (1975) The structure of *Apis dorsata* melittin: phylogenetic relationships between honeybees as deduced from sequence data. *FEBS Lett* 54 (1):100-102
- [324] JM Conlon, A Sonnevend, M Patel, V Camasamudram, N Nowotny, E Zilahi, S Iwamuro, PF Nielsen, T Pal (2003) A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 306 (2):496-500
- [325] A Nascimento, A Chapeaurouge, J Perales, A Sebben, MV Sousa, W Fontes, MS Castro (2007) Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon* 50 (8):1095-1104

- 
- [326] TB Zou, TP He, HB Li, HW Tang, EQ Xia (2016) The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules* 21 (1):72-86
- [327] AT Girgih, R He, S Malomo, M Offengenden, J Wu, RE Aluko (2014) Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods* 6 384-94
- [328] T Sub Laban, A Saadabadi (2020) Monoamine Oxidase Inhibitors (MAOI), En: StatPearls. Treasure Island (FL), (Ed: StatPearls), StatPearls Publishing LLC, p.1-9
- [329] V Filip, E Kolibás (1999) Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. *JPN* 24 (3):234-243
- [330] HO Borbe, G Niebch, B Nickel (1990) Kinetic evaluation of MAO-B-activity following oral administration of selegiline and desmethyl-selegiline in the rat. *J Neural Transm Suppl* 32 :131-137
- [331] F Daneshmand, H Zare-Zardini, L Ebrahimi (2013) Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from *Zizyphus jujuba* fruits. *Nat Prod Res* 27 (24):2292-2296
- [332] D Steverding (2019) On the Reversible and Irreversible Inhibition of Rhodessain by Curcumin. *Molecules* 25 (1):143-157
- [333] J Strelow, W Dewe, PW Iversen, HB Brooks, JA Radding, J McGee, J Weidner. (2004) Mechanism of Action Assays for Enzymes, En: Assay Guidance Manual, (Ed: GS Sittampalam), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, p.1-22
- [334] T Kosasa, Y Kuriya, K Matsui, Y Yamanishi (1999) Inhibitory effects of donepezil hydrochloride (E2020) on cholinesterase activity in brain and peripheral tissues of young and aged rats. *Eur J Pharmacol* 386 (1):7-13
- [335] A Villalobos, JF Blake, CK Biggers, TW Butler, DS Chapin, YL Chen, JL Ives, SB Jones, DR Liston (1994) Novel Benzisoxazole Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J Med Chem* 37 (17):2721-2734

- 
- [336] M Colombres, JP Sagal, NC Inestrosa (2004) An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds. *Curr Pharm Des* 10 (25):3121-3130
- [337] N Tsuno (2009) Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 9 (5):591-598
- [338] JS Kennedy, RJ Polinsky, B Johnson, P Loosen, A Enz, R Laplanche, D Schmidt, LC Mancione, WC Parris, MH Ebert (1999) Preferential cerebrospinal fluid acetylcholinesterase inhibition by rivastigmine in humans. *J Clin Psychopharmacol* 19 (6):513-521
- [339] RJ Polinsky (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. *Clin. Ther.* 20 (4):634-647
- [340] LJ Scott, KL Goa (2000) Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* 60 (5):1095-1122
- [341] A Maelicke, A Schrattenholz, M Samochocki, M Radina, EX Albuquerque (2000) Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 113 (1):199-206
- [342] S Begum, SS Nizami, U Mahmood, S Masood, S Iftikhar, S Saied (2018) In-vitro evaluation and in-silico studies applied on newly synthesized amide derivatives of N-phthaloylglycine as Butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors. *Comput Biol Chem.* 74 :212-217
- [343] BN Sağlık, S Ilgın, Y Özkay (2016) Synthesis of new donepezil analogues and investigation of their effects on cholinesterase enzymes. *Eur J Med Chem.* 124 :1026-40
- [344] M Noetzli, CB Eap (2013) Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Pharmacokinet* 52 (4):225-241
- [345] T Sakano, MI Mahamood, T Yamashita, H Fujitani (2016) Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction. *Biophys Physicobiol.* 13 :181-194
- [346] U Kafurke, A Erijman, Y Aizner, JM Shifman, J Eichler (2015) Synthetic peptides mimicking the binding site of human acetylcholinesterase for its inhibitor fasciculin 2. *J Pep Sci* 21 (9):723-730

- 
- [347] G Kryger, I Silman, JL Sussman (1999) Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept<sup>®</sup>): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* 7 (3):297-307
- [348] D Knez, N Coquelle, A Pisljar, S Zakelj, M Jukic, M Sova, J Mravljak, F Nachon, X Brazzolotto, J Kos, JP Colletier, S Gobec (2018) Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur J Med Chem* 156 :598-617
- [349] L Wang, Y Wang, Y Tian, J Shang, X Sun, H Chen, H Wang, W Tan (2017) Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of chalcone-rivastigmine hybrids as cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 25 (1):360-371
- [350] LT Vezekov, DS Tsekova, I Kostadinova, R Mihaylova, NG Vassilev, ND Danchev (2019) Synthesis of New Galanthamine-Peptide Derivatives Designed for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 16 (3):183-192