



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INHIBICIÓN DEL EFECTO HEMORRÁGICO DEL VENENO DE *Crotalus ruber lucasensis* POR EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE *Brongniartia intermedia* y *Brongniartia montalvoana* Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO EN MODELO MURINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ISRAEL VILLANUEVA SOLIS**

**DIRECTOR DE TESIS:** DR. RICARDO REYES-CHILPA, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**COMITÉ TUTORAL:**

\*DR. GIL MAGOS GUERRERO, DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

\*DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS, UNIDAD PERIFÉRICA DE NEUROCIENCIA UNAM-INNYN, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUAREZ"



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/0945/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de septiembre de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Biología Experimental del estudiante VILLANUEVA SOLIS ISRAEL con número de cuenta 517024856 con la tesis titulada "INHIBICION DEL EFECTO HEMORRÁGICO DEL VENENO DE *Crotalus ruber lucasensis* POR EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE *Brongniartia intermedia* y *Brongniartia montalvoana* Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO EN MODELO MURINO", realizada bajo la dirección del DR. RICARDO REYES CHILPA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente:	DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
Vocal:	DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ
Secretario:	DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
Suplente:	DR. JORGE IVÁN CASTILLO ARELLANO
Suplente:	DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 4 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGNS/VMVA/ASR/grf\*

*Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-4A del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Ricardo Reyes Chilpa.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM**, por darme la oportunidad de cursar la Maestría y los medios necesarios para concluir mis estudios satisfactoriamente.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por proporcionarme la beca CVU # 816105 otorgada para realizar mis estudios.

Al proyecto: “Bioprospección de la flora mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral” 2016-2018. DGAPA-UNAM-PAPIIT IN210016 por el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

A los miembros del comité tutorial:

Al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa (Tutor)**

Al **Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero**

A la **Dra. Mónica Adriana Torres Ramos**

## AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A mi padre **Felipe Villanueva Morales** por su consejo, su apoyo que siempre ha sido motivo de cambios estacionales en mi vida. Gracias por siempre estar a mi lado haciéndome poner los pies en la tierra siempre con el corazón en la mano, gracias por creer en mí en cada paso que he dado, incluso en el más loco, gracias a ti por esa voluntad heredada. No hay persona más significativa y valiosa para mí como tú.

A mi madre **Maria del Rosario Solis Rangel**, por ser el sentimiento y la emoción que habitan en mí, por mostrarme aunque inconscientemente que es importante no solo ser mente, si no sentimiento y espíritu. Sobre todo gracias por tolerar mis decisiones y mi forma de ser. A mi hermano **Felipe Villanueva Solis** por ser esa persona ingeniosa y artística con la que comparto los días entre risas.

Al **Instituto de Química y Laboratorio 2-4 de Productos Naturales** por abrirme las puertas para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa** del Instituto de Química, UNAM, por su valiosa asesoría como mi tutor, su paciencia, y consejo en la resolución de mis dudas. Y por fomentar mi pensamiento crítico y objetivo durante toda la maestría.

Al **Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco**, al **M. en C. Iván Fernando Pozas Ocampo** y al **Dr. Amaury Cordero Tapia**, por su apoyo en la estancia realizada en el Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Baja California Sur, además de los excelentes momentos compartidos.

A la **Dra. Mónica Adriana Torres Ramos**, Unidad Periferia de Neurociencias, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; por todas las observaciones y opiniones realizadas en este trabajo.

Al **Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero**, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. Por su pensamiento crítico que compartió para mejorar este trabajo en cada tutorial y la resolución de diversas dudas.

A la **Dra. Rachel Mata Essayag**, Al **Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez** y Al **Dr. Jorge Iván Catillo Arellano**, miembros del comité revisor, por su tiempo y disposición para las revisiones de la tesis.

A los servicios técnicos y analíticos del IQ:

A **A. Nieto y M.T. Ramírez** del laboratorio de Pruebas Biológicas.

A **L. Velasco, J.F. Pérez y M.C. García** del laboratorio de Espectrometría de Masas.

A **E. Huerta y H. Ríos** del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear.

A **B. Quiroz** del Laboratorio Universitarios de Resonancia Magnética Nuclear, LURMN-IQ-UNAM, el cual fue financiado por CONACyT (0224747) y la UNAM.

A **M. León y E. Tapia** del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural, LANCIC-IQ-UNAM, el cual fue financiado por CONACyT (LN 232619, LN 260779, LN 279740, LN 293904, LN 271614 y LN 293904).

En especial a mis compañeros del laboratorio, **Paola** gracias por tu amistad, las charlas, las risas y tu apoyo; A **Dulce** por tu atención, tu consejo los miles de favores que hiciste por mí.

A **Thalía** por ser la ausencia más presente en mi vida, por la vida y la muerte de una ilusión, por el vendaval y el recuerdo de un edén de manos danzantes.

A **María del Rosario Gonzaga** por ser un eco hermoso para un loco, por tu amor y ternura y sobre todo por todas esas maravillosas experiencias que me han servido de inspiración y me dan fuerza para seguir.

A **Graciela Lorenzo**, sin ti simplemente esto no hubiera sido posible, gracias mí querida amiga por ese gran apoyo del que estoy en deuda eternamente, eres y serás siempre una de las personas que más quiero y admiro.

Al señor **Juan Lorenzo** y la señora **Juana Marques** por abrimme las puertas de su hogar y más importante aún las de su corazón, por el gran apoyo, las pláticas, las risas y sobre todo por ser un ejemplo de gran corazón, ustedes son mis segundos padres jeje.

<b>INDICE</b>	<b>PAG.</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1.1.ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>5</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Aspectos epidemiológicos de la mordedura de serpiente</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Familia Viperidae</b>	<b>8</b>
<b>3.2.1. Descripción de <i>Crotalus ruber</i>, Cope</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2. Distribución y Hábitat</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Química del veneno de la familia Viperidae</b>	<b>11</b>
<b>3.4. Fisiopatología del envenenamiento hemotóxico</b>	<b>15</b>
<b>3.4.1. Hemorragia</b>	<b>15</b>
<b>3.5. Inflamación asociada a la mordedura de serpiente</b>	<b>17</b>
<b>3.6. Faboterapia y Antivenenos</b>	<b>19</b>
<b>3.7. Plantas Alexiviperinas</b>	<b>21</b>
<b>3.8. Actividad biológica de plantas alexíteras sobre el efecto hemorrágico del veneno de serpientes</b>	<b>24</b>
<b>3.9. Género <i>Brongniartia</i></b>	<b>26</b>
<b>3.9.1. Botánica del género <i>Brongniartia</i></b>	<b>26</b>
<b>3.9.2. Descripción Botánica. <i>B. intermedia</i> Moric</b>	<b>27</b>
<b>3.9.3. Descripción Botánica. <i>B. montalvoana</i> O. Dorado et D.M. Arias</b>	<b>28</b>
<b>3.10. Etnobotánica</b>	<b>29</b>

<b>3.11. Química</b>	<b>30</b>
<b>3.12. Quimiotaxonomía</b>	<b>31</b>
<b>4. JUSTIFICACION</b>	<b>33</b>
<b>5. HIPOTESIS</b>	<b>33</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>7. METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
<b>7.1. Colecta de <i>B. intermedia</i></b>	<b>34</b>
<b>7.2. Obtención del material de <i>B. montalvoana</i></b>	<b>36</b>
<b>7.3. Fitoquímica</b>	<b>37</b>
<b>7.3.1. Extracción</b>	<b>37</b>
<b>7.3.2. Análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF)</b>	<b>38</b>
<b>7.3.3. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) de raíz de <i>B. montalvoana</i></b>	<b>38</b>
<b>7.3.4. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) de raíz de <i>Brongniartia intermedia</i></b>	<b>39</b>
<b>7.3.5. Cromatografía en Capa fina Preparativa (CCFp)</b>	<b>41</b>
<b>7.3.6. Columna Cromatográfica (CC) de la fracción 11</b>	<b>41</b>
<b>7.3.7. Extracción alcaloidea de hojas de <i>B. intermedia</i></b>	<b>42</b>
<b>7.4. Ensayos Biológicos</b>	<b>43</b>
<b>7.4.1. Pruebas antihemorrágicas</b>	<b>43</b>
<b>7.4.1.1. Obtención y procesado del veneno</b>	<b>43</b>
<b>7.4.1.2. Modelo de Hemorragia en piel de ratón</b>	<b>44</b>
<b>7.4.1.2.1. Sujetos de estudio (modelo murino)</b>	<b>44</b>
<b>7.4.1.2.2. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)</b>	<b>45</b>

7.4.1.3. Prueba Preliminar para ajuste de DHM	46
7.4.1.4. Pruebas de potencial antihemorrágico	47
7.4.2. Efecto Antiinflamatorio en el Modelo de TPA	49
7.4.3. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)	51
8. RESULTADOS	52
8.1. Fitoquímica	52
8.1.1. Rendimientos	52
8.1.2. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) de raíz de <i>B. montalvoana</i>	53
8.1.3. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) de raíz de <i>B. intermedia</i>	54
8.1.4. Identificación del pterocarpano neorautano	57
8.1.5. Extracción alcaloidea de hojas de <i>B. intermedia</i>	60
8.2. Efecto Antiinflamatorio en el Modelo de TPA	62
8.3. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)	64
8.4. Pruebas antihemorrágicas	65
9. DISCUSION	68
9.1. Fitoquímica	68
9.2. Actividad Biológica	69
9.2.1. Ensayo Antihemorrágico	69
9.2.2. Ensayo Antiinflamatorio	71
10. CONCLUSIONES	73
11. PERSPECTIVAS	75
12. LITERATURA CITADA	76
13. ANEXOS	88

# INDICE DE FIGURAS

PAG.

1.Casos de Mordedura de serpiente en México, reportados durante el periodo del 2004 al 2011	8
2.Vista Lateral-anterior de un Vipérido donde se muestra el Aparato del veneno	9
3.Mapa de distribución de <i>C. ruber</i>	11
4.Mecanismo de acción de las SVMP hemorrágicas	16
5. Principales eventos del sistema inmune que promueven la formación de edema	19
6.Estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos con plantas alexíteras	24
7.Arbusto adulto de <i>B. intermedia</i>	27
8. Estructura de algunos compuestos alexiviperinos pertenecientes a la subfamilia Papilionoideae	32
9.Estrategia experimental	34
10.Colecta de <i>Brongniartia intermedia</i> kunth	35
11. Ficha de colecta de <i>Brongniartia intermedia</i> kunth	36
12.Material <i>B. montalvoana</i>	37
13.Metodología seguida para la fitoquímica de <i>B. montalvoana</i>	39
14.Metodología seguida para la fitoquímica de <i>B. intermedia</i>	40
15.Extracción de alcaloides por acido-base	43
16.Método de extracción manual asistida	44
17. Procedimiento para la técnica del halo hemorrágico de Kondo (1960)	46
18 Incubación de la mezcla veneno más extracto en baño maría	47
19.Delimitación de las áreas hemorrágicas en piel de ratón por medio del software Image J	48
20.Modelo de inflamación en oreja de ratón por TPA	50

21.Fórmula para el rendimiento de los extractos expresado en porcentaje	52
22.CG/EM del extracto hexánico de <i>B. montalvoana</i>	53
23.CCF de las fracciones 1-18 de la CC del extracto diclorometánico de la raíz de <i>B. montalvoana</i>	54
24.CG/EM de la Fracción 1 del extracto diclorometano de <i>B. montalvoana</i>	54
25.CCF de las fracciones 10-18 del extracto diclorometánico de la raíz de <i>B. intermedia</i>	55
26.CCF de los productos de la fracción 11	55
27.CCF del polvo obtenido de la fracción 11 del extracto diclorometánico de la raíz de <i>B. intermedia</i>	56
28. Placa preparativa (CCFp)	57
29.CCF de las fracciones aisladas por placa preparativa	58
30.Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del neorautano	59
31.Espectro de Masas por impacto electrónico del neorautano	60
32.CG/EM FO2 de la extracción de alcaloides de hojas de <i>B. intermedia</i>	61
33.Estructura de los compuestos mayoritarios en la extracción de alcaloides de las hojas de <i>B. intermedia</i> identificados por CG/EM	61
34.Actividad antiinflamatoria de los extractos en el modelo de TPA	62
35.Actividad antiinflamatoria del neorautano en el modelo de TPA	63
36. Curva concentración-respuesta del efecto antiinflamatorio del extracto MeOH de <i>Brogniartia montalvoana</i>	63
37. Curva concentración-respuesta del efecto antiinflamatorio del extracto MeOH de <i>Brogniartia montalvoana</i> en el ensayo de mieloperoxidasa	64
38. Actividad de la enzima mieloperoxidasa (Valores de densidad óptica)	65
39.Actividad antihemorrágica expresada como diámetro del halo hemorrágico	67
40.Actividad antihemorrágica, área expresada como pixeles	67

## **INDICE DE TABLAS**

**PAG.**

<b>1. Principales componentes del veneno de serpiente</b>	<b>13</b>
<b>2. Rendimientos de cada extracto con respecto al peso seco de cada planta</b>	<b>52</b>
<b>3. Principales características del neorautano</b>	<b>58</b>
<b>4. Desplazamientos químicos y asignación con base en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del neorautano</b>	<b>59</b>
<b>5. Comportamiento y efectos observados en la prueba preliminar de DHM</b>	<b>66</b>

## 1 RESUMEN

Los envenenamientos por accidente ofídico se tratan de manera general mediante la administración de sueros antiofídicos derivados de caballos u ovejas; sin embargo, a pesar del éxito a nivel sistémico, esta terapia no es un tratamiento eficaz contra los daños locales que muchas veces terminan en amputación o pérdida de función del miembro afectado. En el caso de las mordeduras de serpientes con veneno de tipo hemotóxico, los efectos locales más severos y de rápida instalación son, la hemorragia y la inflamación.

En México varias plantas se han utilizado en medicina popular como antiofídicas por comunidades y grupos indígenas, esto las convierte en un blanco de estudio para el tratamiento de las mordeduras de serpientes. Entre éstas, se encuentran *Brongniartia montalvoana* y *Brongniartia intermedia* (Fabaceae) reconocidas como plantas alexiviperinas contra serpientes de cascabel. Un pterocarpano, el edunol, aislado de *B. podalyriodes* (“hierba de la víbora”) puede neutralizar la letalidad del veneno de *Bothrops asper* (Viperidae) en ratones.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la actividad de extractos y compuestos de *B. montalvoana* y *B. intermedia* contra los efectos locales del veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus ruber* (Viperidae), así como determinar su efecto antiinflamatorio en un modelo murino.

Se prepararon extractos de diclorometano y metanol de la raíz de ambas plantas y se sometieron a cromatografía en placa fina y columna para aislar algunos de sus constituyentes químicos. Del extracto de diclorometano de *Brongniartia intermedia* se logró aislar el compuesto neorautano cuya estructura se determinó por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas. Este compuesto ha sido aislado previamente en *B. intermedia* y *B. podalyroides*.

La capacidad de los extractos y compuestos para inhibir la hemorragia producida por el veneno de la serpiente *Crotalus ruber* (Viperidae) se probó en modelo murino por la técnica de halo hemorrágico en piel de ratón (Kondo, 1960). Se encontró que

los más potentes fueron el extracto metanólico de *Brongniartia intermedia*, seguido del neorautano.

La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el modelo de inflamación en oreja de ratón por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y mediante la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). El mayor efecto lo presentó el extracto metanólico de *Brongniartia montalvoana*. El neorautano no tuvo efecto en esta prueba. Los resultados de MPO revelaron que el extracto metanólico de *B. montalvoana* disminuyó la actividad de la MPO y ocasionó un rápido efecto de infiltración de neutrófilos.

También se realizó una extracción alcaloidea de las hojas de *Brongniartia intermedia*, la cual fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) indicando que el compuesto mayoritario es el alcaloide esparteína, anteriormente reportado para varias especies del género.

Los resultados obtenidos indican que todos los extractos probados de ambas plantas, tienen actividad sobre los efectos locales del veneno, lo que confirma su uso en la medicina tradicional y plantea un punto de partida para su estudio.

## 1.1 ABSTRACT

Poisonings due to snake bites are treated by the administration of antivenin sera derived from horses or sheep; however, despite their success at the systemic level, this therapy is not an effective against local damages that often end in amputation, or loss of function of the affected member. For instance, in the case of serpent bites with hemotoxic venom, the most severe local effects, and with rapid occurrence, are hemorrhage and inflammation. In Mexico, several plants have been used in folk medicine for the treatment of snake bites by peasants and native people. Among these, are several species of *Brongniartia* (Fabaceae). The pterocarpan, edunol, isolated from the root of *B. podalyriodes* ("snake herb") has been reported experimentally as capable of neutralizing the lethality of the venom of *Bothrops asper* (Viperidae) in mice.

The objective of this work was to determine the activity of extracts and compounds of *Brongniartia intermedia* and *B. montalvoana* against the local effects of rattlesnake venom *Crotalus ruber* (Viperidae), as well as to determine its anti-inflammatory effect in a murine model. Dichloromethane and methanol extracts were prepared from the roots, and subjected to thin-layer and column chromatography to isolate some of their chemical constituents. From the dichloromethane extract of *Brongniartia intermedia* it was possible to isolate the pterocarpan neorautane whose structure was determined by Proton and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance, and mass spectrometry. This compound has previously been isolated from *B. intermedia* and *B. podalyroides*.

The ability of the extracts and compounds to inhibit the haemorrhage produced by the venom of the snake *Crotalus ruber* (Viperidae) was tested in the murine model by the haemorrhagic halo technique in mouse skin (Kondo, 1960). It was found that the most potent was the methanolic extract of *Brongniartia intermedia*, followed by neorautanane. The anti-inflammatory activity was evaluated by the mouse ear inflammation model with 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) and by the activity of the myeloperoxidase enzyme (MPO). The greatest effect was exhibited by the methanolic extract of *Brongniartia montalvoana*, which also decreased the

activity of MPO and caused rapid neutrophil infiltration. Neorautanane had no anti-inflammatory effect. The alkaloid extract of the leaves of *Brongniartia intermedia* was also prepared and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), indicating that the major compound is sparteine, previously reported for several species of the genus. Neorautanane had no effect on this test.

The results obtained indicate that all the tested extracts of both plants have beneficial activities on local effects of the *Crotalus ruber* (Viperidae) poison, which support its use in traditional medicine for treatment of snake bites.

## 2 INTRODUCCION

Los envenenamientos por mordedura de serpiente han sido un problema de salud frecuentemente desatendido en Latinoamérica. En México, por ejemplo, a pesar de que se tienen protocolos para pacientes con ofidiotoxicosis, no están bien distribuidos en todas las clínicas, esto se debe a que la mayor incidencia de mordeduras de serpientes ocurre en las zonas rurales, donde gran parte de la población sólo dispone de los recursos terapéuticos que la naturaleza proporciona, entre ellos, las plantas alexíteras. A éstas se les atribuye la capacidad de aliviar uno o varios síntomas complejos, como son: dolor, sangrado, inflamación, infección e incluso el envenenamiento. Por otro lado, el veneno de las serpientes es una mezcla bioquímicamente compleja, constituida generalmente por toxinas y enzimas. En su hábitat, las serpientes usan el veneno para inmovilizar y efectuar una pre-digestión de su presa, como en el caso del veneno hemotóxico; sin embargo en mordeduras a humanos provoca padecimientos entre los que destacan: una fuerte inflamación, actividad hemorrágica, inhibición de la agregación plaquetaria y degradación de la matriz extracelular, entre otros. La medicina moderna tiene como único tratamiento científicamente validado, la faboterapia que consiste en la administración de antivenenos producidos mediante la inmunización en caballos y ovejas. Los faboterápicos (sueros antiofídicos) son eficaces hasta cierto punto para neutralizar los efectos a nivel sistémico; sin embargo, a nivel local tienen poca o nula actividad sobre el tratamiento de lesiones provocadas por la hemorragia o la necrosis. Los efectos locales de la familia Viperidae actúan muy rápido (4-15 minutos) y en muchos casos causado por el retardo en la administración del antiveneno. Aunado a esto, algunos pacientes presentan rechazo a los faboterápicos, lo que provoca una respuesta inmune exacerbada conocida como “enfermedad del suero”. Dentro del conocimiento de medicina tradicional, México posee un acervo cultural rico en el uso de plantas, donde algunas son utilizadas para aliviar diversos padecimientos provocados por la mordedura de serpientes. De acuerdo con lo anterior, el presente estudio constituye una aportación en la búsqueda de recursos en información dirigidas al tratamiento local del envenenamiento por mordedura de serpiente basado en el conocimiento tradicional de las plantas del género *Brongniartia*.

### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 Aspectos epidemiológicos de la mordedura de serpiente

El accidente ofídico, es la lesión resultante de la mordedura de serpiente, que en el caso de algunas puede ir acompañada de la inoculación de veneno, lo que produce un cuadro característico de alteraciones fisiopatológicas locales y sistémicas denominado ofidiotoxicosis (Villanueva *et al.*, 2004).

Las mordeduras de serpiente son consideradas un problema de salud pública en muchos países tropicales y subtropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado al envenenamiento por mordedura de serpiente entre las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) y entre aquellas asociadas con la pobreza (Perales y Domont, 2002). Cada año se producen unos 5 millones de mordeduras de serpientes, que causan hasta 2,5 millones de casos de envenenamiento, al menos 100,000 muertes y aproximadamente el triple de amputaciones y otras discapacidades permanentes (Kasturiratne *et al.*, 2008)

Es difícil hacer una adecuada estimación de la cantidad de accidentes y muertes provocadas por mordedura de serpiente que hay en cierta región, usualmente se subestima, ya que los registros con los que se hacen dichos censos, corresponden a los casos atendidos en hospitales y difícilmente se toman en consideración aquellos que ocurren en clínicas rurales, esto aunado a que la mayor parte de las personas que sufre un accidente ofídico no asisten a un hospital o clínica, ya que muchas veces no está a su alcance el servicio o prefieren los remedios tradicionales (Harrison *et al.*, 2009); otro aspecto importante es que el accidente ofídico varía mucho de acuerdo con la estación del año y la región geográfica, e incluso las actividades humanas como son agricultura, ganadería o minería, por ejemplo, se ha observado en las actividades agrícolas que la temporada de siembra es donde se reportan más casos ya que la gente se expone más (Gallegos-Flores, 2013).

Aun cuando el número exacto de mordeduras de serpiente se desconoce, la Organización Mundial de la Salud reporta un estimado que va desde un mínimo de 421,000 envenenamientos y 20,000 muertes anuales, hasta 1,841,000

envenenamientos y 94,000 muertes, siendo el número de mordeduras por serpiente de 1, 200,000 a 5, 500,000 por año. La mayoría de estos ocurre en el sur y sureste de Asia, África sub-Sahariana y Centro y Sur América, el número de personas que queda con alguna secuela permanente como resultado del envenenamiento es similar al número de muertes (Kasturiratne *et al.*, 2008; OMS, 2010). En Estados Unidos se reportan oficialmente un promedio anual de 6,000 mordeduras, de las cuales 2,000 son por parte de serpientes venenosas, cinco o seis resultan ser fatales (Gold *et al.*, 2002).

En México, la mordedura de serpiente no representa uno de los mayores problemas sanitarios, por ello se desatiende, sin embargo; en determinadas zonas el accidente ofídico es común y pone en peligro la vida de los pacientes. Las principales responsables de los accidentes ofídicos en México son especies de los Géneros *Bothrops* y *Crotalus*. (Zertuche, 1981; Zabala *et al.*, 2002). De acuerdo con la información proporcionada por el SNV (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2011), la incidencia de mordeduras de serpientes hasta la semana número 52 del año 2011, registró un total acumulado de 3949 en todo el territorio nacional. Las regiones con mayor riesgo se encuentran en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz (Figura 1)

Un estudio nacional de la casuística total, elaborado por Alejandro Carbajal (Com. Pers., 2016) muestra la cantidad de mordeduras de serpiente registradas entre el año 2003 al 2016, donde los estados antes mencionados se confirman como focos de accidentes ofídicos.

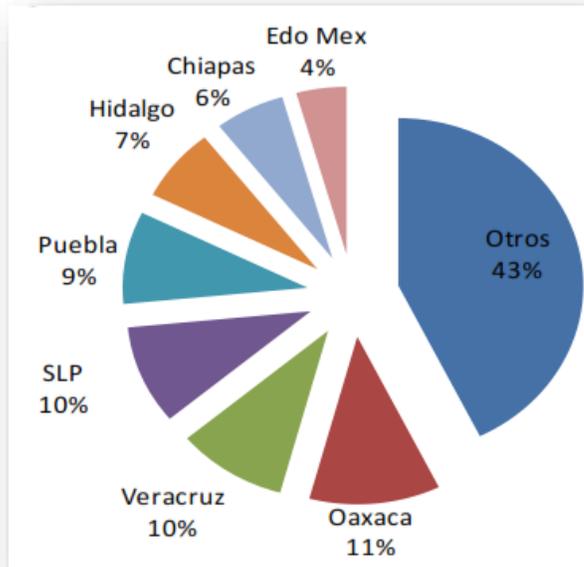


Figura 1. Casos de Mordedura de serpiente en México, reportados durante el periodo del 2004 al 2011. Casos por entidad federativa. CENAVECE 2011. Anuarios de morbilidad DGEPI, SSA. Boletín de Vigilancia Epidemiológica CONABIO 2011.

### 3.2 Familia Viperidae

La familia Viperidae es un grupo de serpientes venenosas que consta de 350 especies y se subdivide en seis subfamilias con una gran variedad de géneros (The Reptil Data Base, 2019). La principal característica que las diferencia es la presencia de una dentición altamente especializada denominada solenoglifa, la cual consiste en el desarrollo de colmillos anteriores alargados y acanalados sobre el hueso maxilar, en reposo. Los colmillos se pliegan hacia atrás contra el techo de la boca y se encierran en una vaina membranosa, este mecanismo permite contener colmillos muy largos en una boca relativamente pequeña. A su vez la dentadura forma parte del aparato del veneno (Figura 2) el cual incluye las glándulas de Dubernoy que por estímulo nervioso secretan el veneno hacia el canal hueco del colmillo, al tiempo que la mandíbula se acomoda para la mordida (Klauber, 1982). Además, estas serpientes tienen una cabeza de forma triangular (esta forma permite el alojamiento de las glándulas venenosas en la parte posterior de la mandíbula), la mayoría son serpientes de cuerpo grueso, poseen ojos con pupilas elípticas; dos fosetas loreales

termorreceptoras ubicadas entre el ojo y las narinas, las cuales les permiten percibir temperaturas externas, ayudando a su defensa o precisando su ataque (Klauber, 1972), las escamas corporales son quilladas lo que hace referencia a un borde que se encuentra en cada escama a la mitad y dan una apariencia de textura áspera. (Vitt y Caldwell, 2009). Se encuentran en la mayor parte del mundo, a excepción de la Antártida, Australia, Hawaii, Madagascar, Nueva Zelanda, varias otras islas aisladas y el norte del Círculo Ártico (Pough *et al.*, 1998).

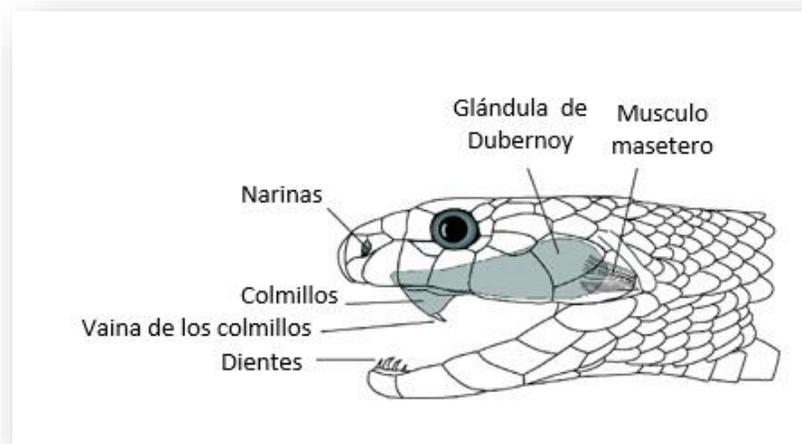


Figura 2. Vista lateral-anterior de un vipérido donde se muestra el aparato del veneno (Vitt y Caldwell, 2009)

Dentro de la familia Viperidae, el género *Crotalus* conocido por la presencia de un crótalo o cascabel, es uno de los géneros más abundantes en México (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014). Además constituye también uno de los que posee más alto índice de mordedura en el país; a continuación se incluye la descripción taxonómica de la especie utilizada en el presente trabajo, así como sus datos de distribución y hábitat.

### 3.2.1 Descripción de *Crotalus ruber*, Cope.

La serpiente de cascabel diamante rojo (*Crotalus ruber*) es una serpiente venenosa perteneciente a la familia Viperidae, su longitud total oscila entre los 100 y 150 cm; algunos autores reconocen al menos cuatro subespecies: *C.r. exsul*, *C.r. lorenzoensis*, *C.r. lucasensis* y *C. r. ruber*. Ernst y Ernst (2012) menciona las

principales diferencias en patrones de coloración de acuerdo con la región donde se distribuyen: en la parte norte la gama de coloración va del rojo ladrillo, gris rojizo, a marrón rosado, en el sur de Baja California, a menudo son de color marrón amarillento a marrón oliva dorsalmente, los diamantes de color marrón rojizo con un borde están presentes en el lado dorsal del cuerpo y pueden estar separados por blanco o marrón en la mitad anterior a dos tercios del cuerpo. Puede haber 20-42 parches o diamantes, aunque 33-35 es habitual. Las escamas dorsales están quilladas, a excepción de las filas laterales 1-2. El segmento más proximal al cascabel es negro, y la cola tiene 2-7 anillos negros justo delante del cascabel (Ernst y Ernst, 2012). En las poblaciones continentales, el cascabel está bien desarrollado, con hasta 13 segmentos (Campbell y Lamar, 2004; Klauber, 1982). Sin embargo, los individuos de la Isla San Lorenzo de Sur pueden perder segmentos del cascabel durante la muda; cerca de la mitad de esta población carece de cascabel (Campbell y Lamar, 2004). El vientre no tiene marcas y es de color blanco a crema. La escama anal no está dividida (Ernst y Ernst, 2012). La cabeza es triangular, rojiza, carece de un patrón dorsal y tiene una línea diagonal oscura que se extiende desde el borde inferior del ojo hasta la comisura de la boca (Ernst y Ernst 2012; Thomson *et al.*, 2016). La franja tiene un borde de color claro anteriormente; un borde posterior puede o no estar presente. Las fosetas termorreceptoras están ubicadas a ambos lados de la cabeza, entre las fosetas nasales y los ojos. El cuello es muy delgado (Thomson *et al.*, 2016). Los machos son más grandes que las hembras (Dugan y Hayes, 2012).

### **3.2.2 Distribución y Hábitat**

La distribución de *Crotalus ruber* (Figura. 3) incluye una porción del suroeste de los Estados Unidos y toda la península de Baja California, así como algunas de las islas del Golfo de California y del Pacífico, en Estados Unidos se distribuye en los condados de San Bernardino, Los Ángeles, Orange, Riverside, Imperial y San Diego. En México se encuentra desde la frontera de los Estados Unidos en toda la península, y en las islas de Ángel de la Guarda, Danzante, Monserrate, Estanque, San José, San Lorenzo de Sur, San Marcos, Cedros y Santa Margarita (Ernst y

Ernst, 2012). Las serpientes de cascabel de diamante rojo viven en desiertos o matorrales costeros, chaparrales, bosques de pino-encino, bosques tropicales caducifolios y, ocasionalmente, en pastizales y otras áreas cultivadas (Campbell y Lamar, 2004).

Habita en climas secos de los tipos BW (seco desértico) y BS (seco estepario); en climas templados y húmedos de tipo Cs (con la temporada de lluvias en la época fría del año), Cw (con la temporada de lluvias en la época calurosa del año); en climas calientes y húmedos del tipo Aw (con larga temporada de secas) y Am (con corta temporada de secas) encontrándose desde el nivel del mar hasta los 1500 m de altitud (Klauber, 1972; Campbell y Lamar, 1989).

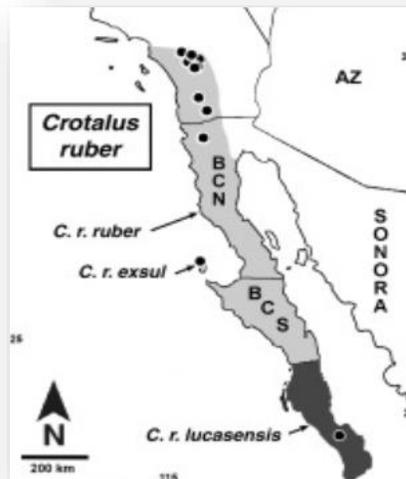


Figura 3. Mapa de distribución de *C. ruber* (Campbell y Lamar, 1989).

### 3.3 Química del veneno de la familia Viperidae

El veneno de las serpientes es una saliva altamente modificada (Navarrete *et al.*, 2010) compuesta principalmente por enzimas y toxinas y tiene dos funciones principales: primero, la inmovilización de la presa y en segundo lugar la digestión de la misma. Las serpientes con importancia médica están agrupadas en dos familias: Viperidae y Elapidae; ambas poseen veneno, pero su composición varía enormemente. Mientras que en Viperidae el veneno es primordialmente enzimático y considerado hemotóxico, en Elapidae está constituido sobre todo por toxinas

haciendo al veneno principalmente neurotóxico. El veneno es sintetizado en las glándulas del Dubernoy e inyectado a la sangre por medio de los colmillos modificados (Hargreaves *et al.*, 2014).

La familia Viperidae es la más importante desde el punto de vista médico en Centro y Sudamérica dentro de ésta, los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Porthidium*, *Bothriopsis* y *Bothriechis* son los responsables del 90-95 % de los accidentes ofídicos por serpientes venenosas (Otero *et al.*, 2002; Cuesta y Restrepo, 2010).

Estudios del proteoma de los venenos de serpientes revelan la existencia de mezclas complejas constituidas por un diverso número de proteínas con actividades muy variadas. Por medio de espectrometría de masas, acopladas con los transcriptomas de las glándulas de veneno se ha podido identificar y clasificar muchas de éstas proteínas (Juárez *et al.*, 2004; Alape-Giron *et al.*, 2008).

Los compuestos presentes en esta familia, se agrupan de acuerdo a su composición bioquímica y sustrato en el que actúan, las clases más importantes son: metaloproteasas del veneno de serpientes dependientes de  $Zn^{2+}$  (SVMPs por sus siglas en inglés), fosfolipasas A de tipo I y tipo II, serin-proteasas, L-amino ácido oxidasas y proteínas sin actividad enzimática como péptidos natriuréticos, desintegrinas, inhibidores de proteasas tipo Kunitz, cistatinas, lectinas específicas de galactosa, lectinas tipo C, factores de crecimiento vascular y CRISP (Proteínas Secretadas Ricas en Cisteína: Li *et al.*, 1994). Sin embargo, el perfil proteico y la abundancia relativa de los diferentes grupos de proteínas varían ampliamente de especie a especie (Bazaa *et al.*, 2005).

De acuerdo con Ohno *et al.* (2003) cada familia proteica posee una gran diversidad estructural y funcional representada por múltiples isoformas provocadas por una evolución acelerada, lo que contribuye a la complejidad en la composición total del veneno y en la diversidad de efectos biológicos. La Tabla 1 muestra un resumen de los principales componentes del veneno así como sus características y acción (Manjunatha, 2006; Panfoli *et al.*, 2010).

Tabla 1.

*Principales componentes del veneno de serpiente.*

<b>ENZIMA</b>	<b>ACCION</b>
<b>ENZIMAS PROTEOLÍTICAS: (PROTEASAS, PEPTIDASAS, HIDROLASAS).</b>	Digestión de proteínas tisulares
<b>FOSFOLIPASAS A Y B</b>	Proteínas de aprox. 13 kDa. Neurotoxina presináptica, enzimas intra y extra celulares que hidrolizan glicerofosfolípidos, son responsables de la inflamación local. Inducen efectos neurotóxicos, cardiotoxico, miotóxico, hemolítico, convulsivo, anticoagulante, antiplaquetario y daño de tejido.
<b>CALICREINAS</b>	Aumento de la permeabilidad capilar, dolor edema, síndrome compartimental y necrosis. Relajación del músculo liso, hipotensión arterial, shock y muerte.
<b>TROMBOSERPENTINAS</b>	Genera trombina anómala, coágulo inestable.
<b>MIOTOXINAS TIPO CROTAMINA</b>	Produce cambios histológicos profundos, muerte celular en las fibras musculares. Inducen parálisis de los miembros
<b>FIBRINOGENASAS ACTIVADORAS DEL FACTOR X</b>	Consumo de fibrinógeno. Coagulación intravascular diseminada.
<b>HIALURONIDASAS</b>	Degrada el tabique intercelular. Favorece la difusión de las demás enzimas y la progresión del edema.
<b>METALOPROTEASAS</b>	Enzimas endoproteolíticas dependientes de iones Zn <sup>++</sup> , degradan proteínas de matriz extracelular y componentes del sistema hemostático, tiene efecto citotóxico en las células del endotelio. La mayoría son fibrinogenasas y algunas inhiben la coagulación sanguínea.
<b>ACETILCOLINESTERASAS</b>	Altera la transmisión neuromuscular
<b>FOSFODIESTERASAS</b>	Desnaturaliza DNA y RNA
<b>CROTOXINAS</b>	Neurotoxicidad y cardiotoxicidad
<b>L-AMINO OXIDASAS</b>	Cataliza la desaminación y genera peróxido de hidrógeno. Inhibe la actividad de Factor X.

ENZIMA	ACCION
<b>PROTEINAS ANTICOAGULANTES NO-ENZIMATICAS</b>	Inhiben los procesos de coagulación por interacción directa con un factor, interfieren con la formación del complejo o inhiben la actividad de una de las proteasas.
<b>LECITINAS TIPO-C</b>	Aglutinan glóbulos rojos o en ocasiones forman parte integral de proteínas pro-coagulantes como el activador Factor X, actúa como subunidad reguladora.
<b>DESINTEGRINAS</b>	Son proteínas de bajo peso molecular (4-15 kDa) inhiben la agregación plaquetaria. Enlazan a las integrinas que se encuentran sobre la superficie de las células y actúan como inhibidores competitivos de sus ligandos. Son un grupo de péptidos que contienen un sitio de reconocimiento a la célula Arg-Gly-Asp, en el carboxilo terminal, actúan como antagonistas de los receptores del fibrinógeno.

El veneno se encuentra sujeto a las interacciones eco-genéticas de la serpiente con el entorno donde se desarrolla, se ha establecido por ejemplo, que los cambios en la composición del veneno relacionados con la edad, permiten la especialización alimentaria en distintos tipos de presa (Martins *et al.*, 2002).

Entre los principales factores que determinan la variación en la composición química de los venenos están, factores ecológicos, geográficos y ontogénicos de los cuales los más importantes son, la dieta, la edad, el sexo y la estación del año (Daltry *et al.*, 1996), razón por la cual, por ejemplo, los sueros antiofídicos norteamericanos son ineficaces frente al veneno de serpientes sudamericanas y viceversa (Charry-Restrepo, 2007).

El género *Crotalus*, posee especies con veneno altamente hemotóxico cuya composición es principalmente SVMPS y serina proteasas, aproximadamente un 69.5% del total del veneno. También se encuentran cuatro familias de proteínas de abundancia media, como las desintegrinas, fosfolipasas A, proteínas secretadas ricas en cisteína (CRISP) y L-amino-ácido oxidasas que representan el 25.8% del total de las proteínas del veneno (Calvete *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Glenn y Straight (1985) menciona que para el veneno de *C. ruber ruber* el

rendimiento del veneno es mayor que en otras especies, lo que se traduce en un peso seco alto y un contenido proteico mayor.

### **3.4 Fisiopatología del envenenamiento hemotóxico**

#### **3.4.1 Hemorragia**

El sangrado local y sistémico constituye una de las consecuencias más comunes de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, el cual contribuye al desarrollo de lesiones tisulares permanentes en el tejido muscular, así como a hipovolemia y choque cardiovascular (Fan y Cardoso 1995; Gutiérrez *et al.*, 1995). El mecanismo de acción exacto no está totalmente dilucidado; sin embargo, los estudios efectuados proponen la hipótesis de que las SVMPs son las principales enzimas directamente relacionadas con la hemorragia y que estructuralmente guardan similitudes bien conservadas en todos los venenos de serpientes. Las metaloproteasas hemorrágicas se clasifican, desde el punto de vista estructural, en cuatro grupos, con base en los dominios que poseen (Bjarnason y Fox, 1994). Las de la clase P-I presentan únicamente el dominio metaloproteasa, caracterizado por una secuencia consenso HEXXHXXGXXH responsable de la unión al zinc. Las metaloproteasas clase P-II poseen el dominio metaloproteasa asociado a un dominio “tipo desintegrina”. Las de la clase P-III poseen el dominio metaloproteasa y desintegrina asociado a un tercer dominio rico en cisteína y finalmente las clase P-IV que poseen los dominios mencionados asociados a un cuarto dominio, el de “tipo lecitina” (Kamiguti *et al.*, 1996)

La presencia de estos dominios adicionales, especialmente el ‘tipo desintegrina’, le confieren a estas metaloproteasas la capacidad de reconocer receptores de la familia de las integrinas en las membranas de las plaquetas y de otros tipos celulares, afectando el proceso de agregación plaquetaria y la adhesión de otras células a sustratos de matriz extracelular (Souza *et al.*, 2000; Moura da Silva *et al.*, 2001). Se ha propuesto que la presencia de estos dominios adicionales es responsable de la mayor actividad hemorrágica que caracteriza a estas metaloproteasas cuando se las compara con las de la clase P-I.

El estudio de la estructura y función de las SVMPs permitió proponer la hipótesis de que estas enzimas hidrolizan las proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y de las vénulas, provocando que en las células endoteliales se desarrollen una serie de vesículas y reduciendo su grosor, hasta el punto en que su integridad se interrumpe y se producen rupturas resultando en la extravasación de la sangre (Moreira *et al.*, 1994; Gutiérrez y Rucavado, 2000).

Esta hipótesis es apoyada por las observaciones bioquímicas y ultraestructurales de Escalante *et al.* (2011). quienes sugieren que el daño a los vasos capilares inducido por SVMPs hemorrágicas se produce por un mecanismo de dos pasos (Figura. 4). En el primer paso, las SVMPs se unen e hidrolizan a los componentes estructurales críticos de la membrana basal de los vasos capilares, particularmente el colágeno tipo IV y el perlecán y posiblemente otras moléculas que conectan la membrana basal con la matriz extracelular fibrilar. La escisión de los enlaces peptídicos clave de los componentes de la membrana basal da como resultado el debilitamiento mecánico de esta estructura de andamio. Como consecuencia, en el segundo paso, las fuerzas hemodinámicas que operan normalmente en la microcirculación, es decir, la presión hidrostática, que determina en gran medida la tensión de la pared y el esfuerzo de corte, inducen una distensión de la pared del vaso, hasta que el capilar se rompe, con la consecuente extravasación de la sangre.

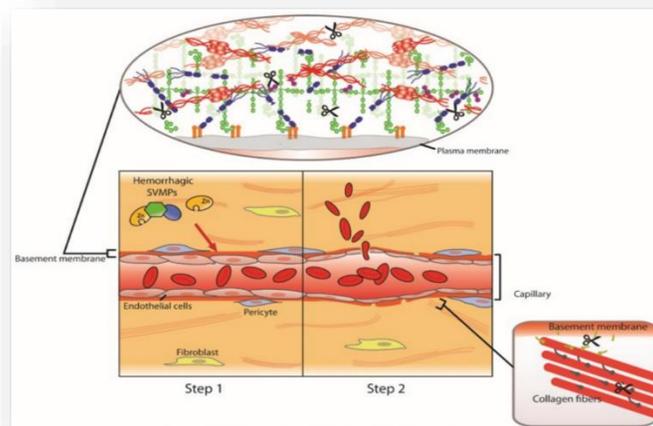


Figura 4. Modelo de dos pasos propuesto por Escalante *et al.* (2011) para explicar el mecanismo de acción de las SVMP hemorrágicas.

### 3.5 Inflamación asociada a la mordedura de serpiente

Como se mencionó anteriormente, uno de los efectos más importantes de la mordedura de serpiente es la inflamación. De manera general la inflamación es una reacción o proceso adaptativo natural mediante el cual los tejidos responden a las lesiones por agentes de diversos tipos como pueden ser microorganismos, traumatismos, necrosis, agentes químicos o físicos, reacciones inmunitarias entre otros. Es una respuesta protectora que surge con el fin de aislar, contener la lesión, destruir al agente agresor y posteriormente preparar al tejido dañado para su reparación volviendo así a un estado de homeostasis (Ríos-Dalenz, 1996). La inflamación y el dolor son una característica importante del envenenamiento por serpientes de la familia viperidae en especial del género *Crotalus*, ya que estos efectos son los primeros en instalarse (Chaves, Barboza y Gutierrez, 1995; Chacur *et al.*, 2001; Gutierrez y Lomonte, 2003). El curso del edema producido depende en gran medida de la dosis de veneno inyectado, en el caso de *Bothrops asper* (Viperidae), en ensayos con almohadilla plantar de ratón, observaron que a dosis bajas el edema alcanza su punto máximo dentro de la primera hora y cae en intervalos de tiempo posteriores (Lomonte *et al.*, 1993). Cuando se administran dosis más altas, el edema persiste durante intervalos de tiempo más prolongados (Gutiérrez *et al.*, 1980a; Chaves *et al.*, 1995; Lomonte *et al.*, 1993). La inflamación comúnmente provoca complicaciones, que de no ser tratadas conducen a la pérdida permanente del tejido, discapacidad o amputación (Ribeiro y Jorge, 1997; Jorge, Ribeiro y O'Connell, 1999) y pueden poner en peligro la vida.

La formación del edema por mordedura de serpiente venenosa tiene un origen multifactorial y obedece a complejos procesos (Figura 5) cuando el veneno ingresa en el organismo se desencadena un proceso inflamatorio por la síntesis y liberación de múltiples mediadores que inducen incrementos en la permeabilidad de la microvasculatura, provocan infiltrado celular, edema y dolor (Teixeira *et al.*, 2003a; Gutierrez *et al.*, 2009). Estos mediadores son principalmente citocinas, eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas y aminas vasoactivas, los cuales son sintetizados en la circulación o cerca de la lesión de las células endoteliales y las

células residentes como mastocitos, macrófagos tisulares y células dendríticas. Al mismo tiempo, los leucocitos circulantes, inicialmente neutrófilos, migran al sitio de la lesión bajo la influencia de agentes quimiotácticos. La formación del edema, en el caso de la mordedura con inoculación de veneno, se asocia a la presencia de sustancias como fosfolipasas A2, metaloproteasas, péptidos vasoactivos y serina proteasas. Las fosfolipasas A2 son sustancias con la capacidad de desgranular mastocitos, liberar histamina y generar ácido araquidónico; mientras que las metaloproteasas provocan un incremento de la permeabilidad capilar, los principales mediadores de la inflamación encontrados por inducción con veneno de *B. asper* en exudados inflamatorios de ratones son citocinas inflamatorias interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), así como el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). (Zamuner *et al.*, 2001, 2005). También se ha observado la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en tejidos plantares de ratón inyectados con veneno viperino, al notar esto Olivo *et al.* (2007) trataron a los ratones con un inhibidor selectivo de la COX-2 y observaron que se redujo notablemente la inflamación, por lo que los metabolitos asociados a la vía de la COX-2 desempeñan un papel en la actividad inductora del veneno.

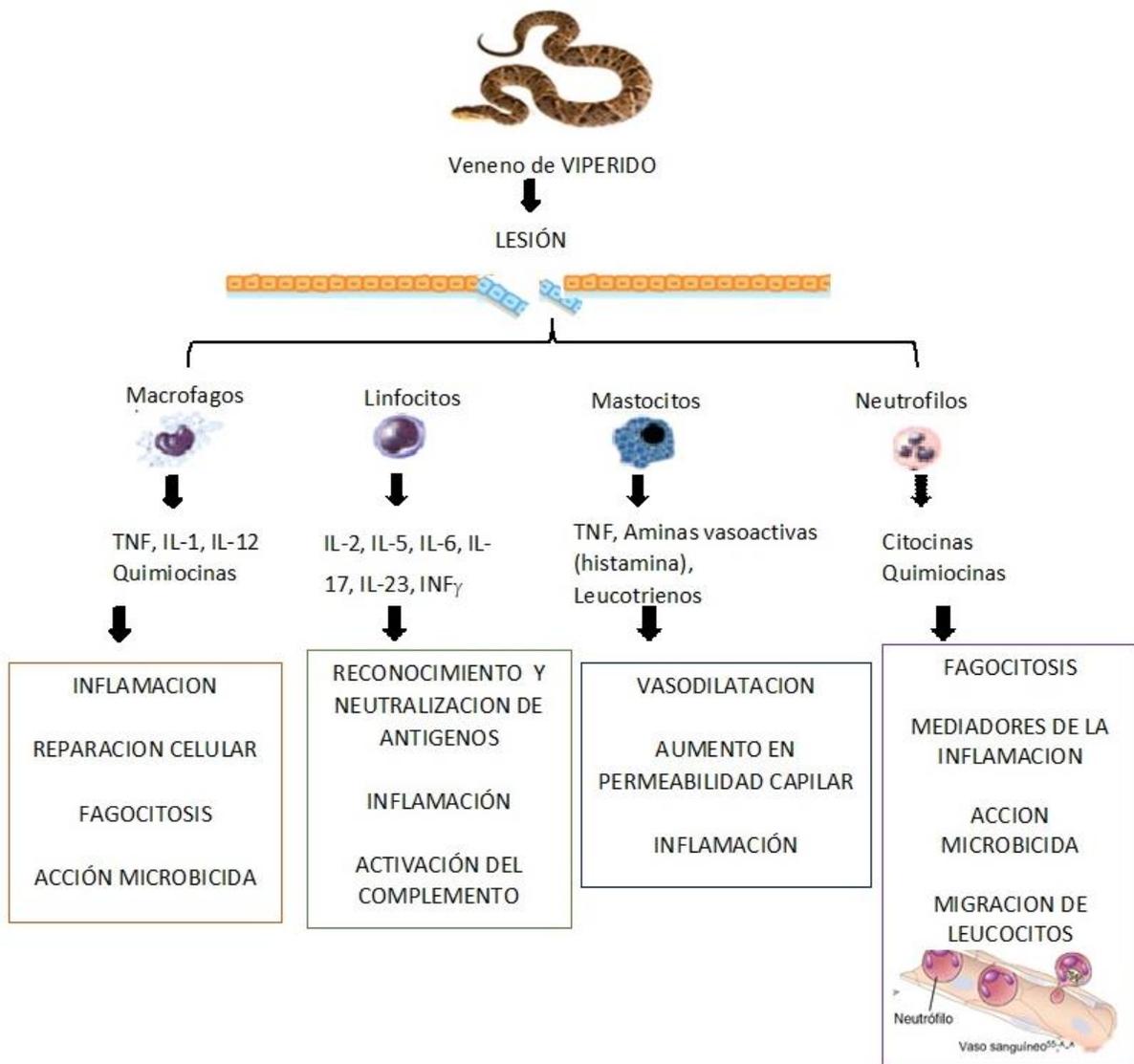


Figura 5. Principales eventos del sistema inmune que promueven la formación de edema causados por la mordedura y el veneno de serpiente (Israel Villanueva, 2019). TNF: Factor de necrosis tumoral. IL: Interleucina. INF: Interferon.

Se ha observado sobre todo en *Bothrops asper*, que la terapia con antiviperinos no revierte los efectos locales del envenenamiento, donde el edema inducido por esta especie no se neutraliza, incluso aunque el antiviperino se incuba previamente con el veneno antes de inyectarlo en los ratones (Gutiérrez *et al.*, 1981a, 1986b).

### 3.6 Faboterapia y Antivenenos

Como se mencionó anteriormente, el único tratamiento científicamente validado para mordedura de serpiente en la actualidad son los faboterápicos comúnmente conocidos como antiviperinos, estos han sido utilizados por más de un siglo con pocos cambios en el método por el cual se sintetizan, entre estos cambios está el desarrollo de una versión liofilizada que es costosa pero útil en cuanto a su almacenamiento en áreas rurales, donde no hay electricidad para mantener refrigeradores. Estos productos se componen de anticuerpos preparados del suero o plasma de animales inmunizados (caballos u ovejas por lo general), básicamente son proteínas heterólogas, por ésta razón el uso para el tratamiento en humanos conlleva la posibilidad de que ocurran reacciones adversas como el riesgo de anafilaxia fatal y enfermedad del suero, una reacción retardada en la cual el paciente sufre de síntomas similares a la malaria, durante días, debido a la activación exacerbada del sistema inmune (Morais y Massaldi 2009), otro aspecto importante es que la producción de estos sueros se ha ido a la baja para varios laboratorios farmacéuticos, por la dificultad de su comercialización y la reducción en sus ganancias (Espino-Solis *et al.*, 2009).

Dependiendo del tipo de molécula neutralizante como componente de los antivenenos, estos pueden ser: preparaciones de inmunoglobulinas IgG completas o fragmentos de ellas ( $F(ab')_2$  o Fab), con un peso molecular de 150 kDa, 100 kDa y 50 kDa respectivamente. También se denominan faboterápicos debido a la fracción de molécula que predomina, llamada  $F(ab')_2$ , estas fracciones se sintetizan a partir de digeridos de pepsina de las inmunoglobulinas IgG, posteriormente pasan por un fraccionamiento con sulfato de amonio; después del tratamiento enzimático, los fragmentos  $F(ab')_2$  son purificados (Ortega, 2008).

El tiempo de eliminación de los fragmentos F(ab) es de aproximadamente cuatro días, actúan formando complejos veneno-faboterápico en la sangre, el resultado es la neutralización del veneno que llega al torrente sanguíneo tanto en la fase temprana como tardía del envenenamiento. Los antivenenos han demostrado en la

práctica ser efectivos a nivel sistémico, cuando se administran a tiempo y en las dosis correctas (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Gutiérrez y León (2009) han propuesto el siguiente mecanismo mediante el cual, los faboterápicos neutralizan el componente enzimático del veneno: 1) Unión de los paratopes del anticuerpo a los epítopes que se encuentran en el sitio catalítico de la enzima. 2) Unión de los anticuerpos a los epítopes localizados muy cerca del sitio activo, ejercen inhibición de tipo estérico. 3) Unión de los anticuerpos a sitios alejados del sitio activo, produciéndose la neutralización por cambios alostéricos, lo que da como resultado falta de unión a tejido o células blanco.

La investigación actual reporta tratamientos experimentales nuevos contra el veneno de serpientes sobre todo para la familia Elapidae, entre ellos, los anticuerpos monoclonales que se usan para formular un antiveneno específico contra las dendrotoxinas presentes en el veneno de la mamba negra (*Dendroaspis polylepis*) utilizando una biblioteca de anticuerpos, que contienen genes humanos extraídos de glóbulos blancos en la sangre del donante. Laustsen *et al.*, (2015) mencionan que estos genes se insertan en partículas de virus modificados genéticamente que pueden expresar los anticuerpos humanos deseados en su superficie. Estas partículas de virus se utilizan luego para detectar y encontrar anticuerpos humanos que pueden unirse a las dendrotoxinas.

De acuerdo con todo lo anterior, si bien los antiviperinos han demostrado una gran efectividad a nivel sistémico, tienen factores importantes en contra como, ser poco efectivos contra los efectos locales como la inflamación y la hemorragia local, presentar efectos secundarios como la enfermedad del suero, además de que mucha gente no tiene acceso a ellos y utilizan otros medios para tratarlas, como las plantas medicinales.

### **3.7 Plantas Alexiviperinas**

Alexiviperino proviene de *allexei*: defender y *vipera*: serpiente, "que combate el veneno de serpientes". Se conocen como alexiviperinas, aquellas plantas que poseen la propiedad de contrarrestar el veneno de un animal, principalmente de serpientes (Reyes-Chilpa y Jiménez, 1995).

Este tipo de plantas se han usado desde la antigüedad en diversas culturas de varios países, como ejemplo, en la etnomedicina del norte argentino se atribuyen propiedades alexiviperinas a plantas identificadas con los nombres vernáculos de “contrayerba”, “yerba de la víbora”, “yerba del colmillo de la víbora”, “mbói kaá” y “cipó de cobra” (Ricciardi, 2007). Otro ejemplo es el de Alzate-Echeverri (2003), quien narra las experiencias de José Celestino Mutis sobre la planta conocida con el nombre de “Guaco” utilizada como antiofídico mencionando como era usada por curanderos negros en la Habana, preparando un zumo que era bebido, posteriormente hacían ocho incisiones (una en cada pie, otra en el índice y en el pulgar de cada mano y las dos últimas en el pecho); cuando la sangre empezaba a salir por las heridas, el curandero derramaba encima de ellas un poco del zumo y procedía a frotar cada herida con la hoja. Después de realizada esta operación, los curanderos decían que la persona podía considerarse “curada” ahora podían manipular serpiente sin peligro.

En México, el uso de las plantas alexiviperinas data de la época prehispánica. Como ejemplo Francisco Hernández el protomédico del siglo XVI, en su obra "Historia de las Plantas de la Nueva España" cita 19 plantas usadas con este fin. También el cronista del siglo XVI, Fray Bernardino de Sahagún, quien registró el uso de remedios vegetales para las mordeduras de serpientes entre los antiguos mexicanos, entre ellos el "picietl" o tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Noriega, 1993; Reyes, 1994).

La capacidad de neutralizar un veneno sólo se atribuye a unas cuantas plantas en relación a aquellas que sirven para su tratamiento. Un ejemplo lo ofrecen los procedimientos seguidos por Pedro Hernández, curandero chinanteco de Jalahui, estado de Oaxaca, México (Heinrich, Velazco y Ramos, 1990). Éste curandero ocupa aproximadamente 53 plantas para el tratamiento de la mordedura de serpiente, la mayoría para lavar la herida, bajar la inflamación e incluso como parte de una “limpia” asociada a la curación del paciente; entre la plantas que utiliza directamente en la herida están *Asclepias curacassavica*, *Eupatorium macrophyllum*, *Siparuna andina*, *Solanum diflorum*, *S. torvum*, *Verbesina oncofera*,

éstas plantas las aplica en forma de cataplasma a partir de hojas frescas; mientras que para “sacar el veneno” utiliza una hoja de *Dorstenia contrajerva* previamente calentada en el comal o con una cataplasma del camote hervido de *Philodendron hederaceum*.

En la actualidad las plantas se estudian con base a los reportes de la etnomedicina para poder brindar alternativas en el tratamiento de personas sensibles al suero faboterápico; sin embargo la mayor parte de las plantas y remedios tradicionales de las que se tienen un registro etnobotánico de uso contra mordedura de serpiente, no han sido probados clínicamente y se conoce poco o nada de sus principios activos.

Soares *et al.* (2005) hace una revisión de estudios sobre plantas que muestran propiedades neutralizantes contra los venenos de serpientes haciendo énfasis en (i) la parte de la planta utilizada como antídoto, (ii) su respectivo género y familia y (iii) la inhibición de las principales actividades farmacológicas, tóxicas y enzimáticas de los venenos de serpientes. Los resultados se muestran en los gráficos de la Figura 6, donde se puede apreciar que el continente en el que se han estudiado más las plantas antiofídicas es en América, las partes que han sido mayormente reportadas son hojas y raíces. Por otro lado, la mayor parte de estudios se han orientado a investigación etnofarmacológica (47%) y muy poco a actividades específicas como su potencial anti PLA2 o su potencial antihemorrágico. También se observa que los géneros en los que se ha probado inhibición por plantas, son en su mayoría *Bothrops* (Viperidae) y *Micrurus* (Elapidae). La actividad protectora de algunas de estas plantas contra la acción letal de los venenos de serpientes ha sido confirmada por ensayos biológicos. Los compuestos en todos ellos pertenecen a clases químicas capaces de interactuar con dianas macromoleculares (enzimas o receptores).

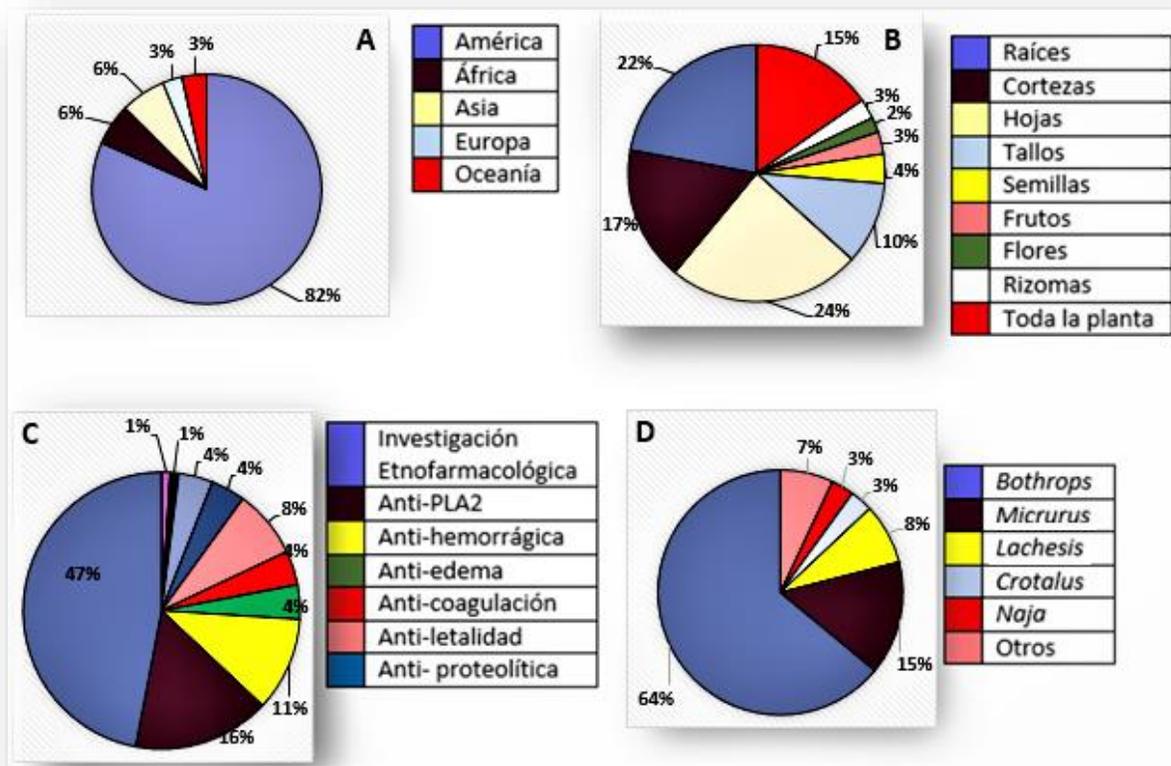


Figura 6. Estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos con plantas alexíteras. (A): Distribución geográfica de los estudios correlacionados con plantas antiofídicas en el mundo. (B): partes de las plantas correlacionadas con la actividad antiofídica. (C): Investigación etnobotánica y etnofarmacológica. Actividades de veneno de serpiente neutralizadas por las plantas. (D): Géneros de serpientes inhibidos por las plantas antiofídicas. (Modificada de: Soares *et al.*, 2005).

### 3.8 Actividad biológica de plantas alexíteras sobre el efecto hemorrágico del veneno de serpientes

Ya que el efecto hemorrágico del veneno de serpientes es una de las manifestaciones más importantes y de rápida instalación, se ha tomado la iniciativa de buscar alternativas naturales que permitan hacer frente a éste y otros efectos locales que provoca la ofidiotoxicosis, para ello la investigación fitoquímica ha avanzado en el estudio de los efectos inhibitorios de diversos extractos crudos de plantas y el aislamiento de distintos componentes puros y semipuros, probando su potencial en varios modelos biológicos que permitan confirmar si ciertas plantas poseen actividad sobre uno o varios efectos del veneno o de la mordedura de serpiente en sí.

Uno de estos trabajos es el realizado por Castro *et al.* (1999) quienes estudiaron el efecto antihemorrágico de plantas tropicales de Costa Rica contra el veneno de *Bothrops asper*, para ello determinaron mediante el método de Kondo (1960) la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), que para esta especie fue de 2 µg, posteriormente utilizaron una dosis de reto de 20 µg de veneno incubándolos con 1mg de extracto para 48 plantas, manteniendo una relación 1:50 veneno: extracto; Los resultados muestran que de los 52 extractos evaluados 10 de ellos neutralizaron en su totalidad la actividad hemorrágica y otros ocho lo hicieron de manera parcial.

La actividad antihemorrágica de plantas sobre el veneno de *Bothrops asper* también fue evaluada por Badilla-Baltodano *et al.* (2006) quienes probaron extractos acuosos de cinco plantas reportadas en la etnomedicina. Usaron extractos liofilizados de las hojas de *Buddleja americana*, *Mikania guaco*, *Piper darienense*, *Vernonia patens* y de la raíz de *Echinacea purpurea*, utilizaron grupos de cuatro ratones y siete concentraciones de los extractos liofilizados de las plantas (2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 mg) que se preincubaron con 200 µg/mL del veneno de *B. asper*, esto con el fin de obtener una gama en la relación extracto/veneno, posteriormente inyectaron 100 µL de cada sobrenadante en la piel del abdomen de los animales de experimentación, lo que correspondería a 10 DHM de veneno (1DHM=2 µg), posteriormente midieron el diámetro de la hemorragia. Sus resultados mostraron que *Vernonia patens* neutraliza significativamente este efecto a una concentración de 10mg extracto/200 µg de veneno y 40mg extracto/ 200 µg veneno en 1 ml, los demás extractos mostraron un efecto estadísticamente no significativo. Otro estudio es el de Vásquez- Escobar (2012), quienes realizaron la prueba para inhibir la actividad hemorrágica de *Bothrops asper* con plantas de la familia Zingiberaceae, prepararon mezclas (peso/peso) de dos dosis hemorrágicas mínimas del veneno (3.2 µg/ratón) y extractos de las plantas en proporción 1:20 disueltas en 0.1ml de PBS pH 7.2, se inyectaron grupos de cuatro ratones por extracto y el veneno como control positivo a dos ratones y se medían los halos hemorrágicos de las muestras evaluadas; las hojas de *Renealmia nicolaioides*, *R. alpinia*, y la raíz de *Alpinia purpurata* presentaron una inhibición notoria de la actividad hemorrágica.

Chacko *et al.* (2012) probaron el extracto metanólico de *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) el cual fue evaluado por su eficacia para neutralizar la letalidad, la actividad necrotizante, la formación de edema y la actividad hemorrágica del veneno de *Vipera russelli*; En este caso la DHM usada fue 24 µg/200 g rata; La vía de administración del extracto fue oral a diferentes dosis (100, 200 y 400 mg/kg); Los controles usados fueron (-) veneno y (+)antiveneno polivalente. El extracto probado a todas las dosis mostró efecto en la letalidad contra 2 DL50 y 3 DL50, a su vez mostró efecto inhibitorio en la inducción de hemorragia y necrosis por el veneno; La actividad antiinflamatoria fue significativa a dosis de 200 y 400 mg/kg.

### **3.9 Género *Brongniartia***

#### **3.9.1 Botánica del género *Brongniartia***

El género *Brongniartia* agrupa a 79 especies descritas y de estas, solo 58 aceptadas (The Plant List 2010), es casi endémico de México a excepción de una sola especie que se extiende hasta el territorio de Texas (Sousa y Delgado, 1993), por lo que las especies se consideran principalmente como propias de la flora mexicana. En general se encuentra en regiones de clima cálido-seco, pero presenta una distribución restringida: las laderas occidentales del país, primordialmente en la parte noroeste y sur de México (Dorado, 1987). Son plantas arbustivas erguidas, con hojas imparipinnadas, foliolos numerosos, con flores axilares, corola café-rojiza o purpura, pétalos unguiculados, casi del mismo largo; estandarte ovado; legumbre oblonga o anchamente linear, plano-comprimida, dehiscente, coriácea; semillas ovadas (Kunth, 1824).

De acuerdo con Sousa y Delgado (1993) el gran número de especies, endemismo y circunscripción geográfica sugieren que se trata de un género muy antiguo con una rápida especiación, aun sin tiempo suficiente para colonizar áreas circunvecinas de climas similares e invadir otros ecosistemas. A continuación se presenta la descripción de las especies de este género usadas en el presente estudio.

### 3.9.2 Descripción Botánica de *Brongniartia intermedia* Moric.



Figura 7. Arbusto adulto de *B. intermedia*.  
Cerro Tetzcutzinco, Estado de México, julio 2017.

*Brongniartia intermedia* (Figura 7) es un arbusto erguido de la familia Fabaceae, de 50 cm a 2.5 m de alto, tallo cubierto de pelillos; hojas alternas cortamente pecioladas de hasta 20 cm de largo compuestas de 11 a 37 hojitas opuestas llamadas foliolos de 2.5 cm de largo y 1 cm de ancho con el ápice redondeado pero con mucrón, es decir un pequeño pico, los foliolos cubiertos de pelillos cuando jóvenes y que se pierden en la madurez. Las flores son solitarias o en pares ubicadas en las axilas de las hojas, cada flor con una bráctea en la base del pedúnculo, las flores de hasta 2 cm tienen un cáliz acampanado terminado en 5 lóbulos, dos de ellos unidos y los otros tres casi libres cubiertos de pelillos, la corola roja o morada de 5 pétalos desiguales, el más externo llamado estandarte es más ancho y vistoso, junto a un par de pétalos laterales similares entre sí llamados alas y por último dos más internos también similares entre sí y generalmente fusionados forman la quilla que envuelve estambres y ovario; los frutos son legumbres colgantes de hasta 7.5 cm de largo y hasta 2 cm de ancho, aplanadas y coriáceas, lisas y sin pelillos que al madurar dejan salir las semillas de hasta 1 cm de diámetro, lisas y de color café-

rojizo. Una especie bastante variable en cuanto al tamaño de la planta, de los foliolos y de las flores, así como al grado de pubescencia (pelillos para retener el rocío) en general. Es una planta perenne (Rzendowsky *et al.*, 2005).

Esta especie se encuentra en regiones de clima cálido-seco. En el Valle de México se encuentra entre los 2300 y 2600 m de altitud, en sitios con pastizal y matorral. Fuera del Valle se extiende desde San Luis Potosí a Jalisco y Oaxaca (Rzendowsky *et al.*, 1979).

### **3.9.3 Descripción Botánica de *Brongniartia montalvoana* O. Dorado et D.M. Arias**

Árbol pequeño de hasta 6.5 m de alto; la corteza grisácea y comúnmente escamosa; ramas maduras grisáceas, glabras o esparcidamente pilosas. Estípulas 1.0-3.1 cm de largo, (0.23) 0.5-1.1cm de ancho, oblicuamente ovadas a muy ampliamente ovadas, u oblicuamente lanceoladas a linear lanceoladas, por lo general deciduas en hojas maduras, tomentulosas o esparcidamente pilosas. Venación por lo común conspicua, con tricomas blanquecinos. Hojas (2.1) 8-28 cm de largo; peciolo 1.7-2.5 cm de largo; raquis (1.8) 6.0-20cm de largo, con 11-19 foliolos opuestos; lamina ovada, elíptica u oblonga, textura más bien coriácea, tomentulosa o esparcidamente pilosa con tricomas blanquecinos o de color castaño oscuro. Flores desarrollándose en ramas (hasta 30cm de largo) sin hojas (aparentando ser racimos), solitarias o 2-3 por nudo; pedicelos (0.5) 0.8-2.8 cm de largo, erectos, tomentulosos o canescentes, con tricomas 0.6-1.3 mm de largo, blanquecinos o pardos. Bracteolas ausentes, en su lugar existe pubescencia más densamente distribuida (en la unión del cáliz con el pedicelo); cáliz 1.6-2.2 cm de largo, 6-9 mm de ancho, campanulado tomentuloso, con tricomas de hasta 1mm de largo y de color pardo oscuro, pétalos de color marrón pálido a rosado; estandarte 2.1-2.6 cm de largo (incluyendo la uña), (8.0) 8.5-9.5 mm de ancho. Fruto (5.7) 6.4-8.3 cm de largo, 1.5-1.9 cm de ancho, oblongo o algunas veces oblanceolado, estípite 3-6 mm de largo, ala del fruto 0.5-0.9 mm de ancho. Semillas 6-8 por fruto, 8.2-8.7 mm de largo, 5.4-6.4 mm de ancho, elipsoides, pardas o pardas oscuras, con manchas negras (Dorado y Arias *op. cit.*)

*Brongniartia montalvoana* se distribuye en la región central de la cuenca del Río Balsas, en la parte sur de Morelos, suroeste de Puebla y en la zona norte y central de Guerrero a altitudes de 900-1500 m. Se desarrolla en bosques de encino, bosque tropical caducifolio y en palmares de *Brahea* en lugares con suelos calizos de la región del Río Balsas (Dorado y Arias 1992)

### 3.10 Etnobotánica

El género *Brongniartia* se ha empleado principalmente para tres usos en la medicina tradicional: 1) Tratamiento de mordeduras de serpientes, 2) Tratamiento de enfermedades parasitarias externas (piojos, pulgas y ácaros), y 3) como venenos para pescar. Por ejemplo las hojas de *Brongniartia glabrata* y *Brongniartia podalyriodes* llamada también "hierba de la víbora" se han empleado en Sinaloa como remedio para las mordeduras de serpientes de cascabel (Standley, 1922). Las raíces de *Brongniartia goldmanii*, también se usan contra la ponzoña (Shapiro, 1976 MEXU, 286). De acuerdo a testimonios orales recogidos, las raíces de *Brongniartia spp.* se aplican principalmente al ganado, machacadas sobre las mordeduras (Reyes, 1994).

En Michoacán particularmente en el municipio de Huetamo, *B. podalyriodes* "La Cahuiriquilla" como le llaman en idioma tarasco, se utiliza principalmente para el tratamiento de la sarna, haciendo un cocimiento de ramas y hojas y posteriormente dando baños tópicos, este cocimiento es usado para matar piojos, por medio de lavados en el cabello (Soto-Núñez, 1987). Uso similar al que le han dado en Sonora el grupo de los Pimas Bajos, utiliza la corteza de *B. palmeri* a la que llaman "palo piojo", para preparar una loción usada también para eliminar piojos y pulgas en animales y humanos. Los Tepehuas en el sur de Chihuahua utilizan la corteza de *Brongniartia sp.* con la que preparan una loción contra las pulgas y que ésta es usada tanto en los animales como en el humano (Pennington, 1967). De acuerdo con Secoy y Smith (1983) de un espécimen del género *Brongniartia* posiblemente *palmeri*, se usa el macerado de la planta completa como barbasco de tal manera que la masa resultante es depositada en un canasto en los sitios de pesca y arman presas rudimentarias fabricadas con piedras en los arroyos facilitando la labor.

### 3.11 Química

Se han realizado algunos trabajos acerca de la fitoquímica del género pudiéndose aislar varios compuestos importantes, sin embargo existe aún mucho que investigar al respecto dado que son pocas las especies del género que se han estudiado Rydberg (1923), como lo refiere Dorado (1992): “Este género ha sido bien estudiado desde el punto de vista taxonómico pero es prácticamente desconocido desde el punto de vista químico y farmacológico”.

Algunas de las primeras investigaciones son las de Corona (1993) quien aisló del extracto metanólico de las raíces de *Brongniartia intermedia*, la 4-hidroxidehidro kavaina, el 3,5-diprenil-p-hidroxi cinamato de metilo,  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol. Por otro lado Reyes (1994) aisló de las raíces de *B. podalyrioides* los pterocarpanos, (-)-edunol, neorautenol, 3'-epineurautenol; así como otros isoflavonoides del tipo de los cumestanos, 3-aril-cumarinas, benzofuranos y una estilipirona, la 4'-hidroxidehidrokavaína.

De acuerdo con el estudio hecho por Greinwald *et al.* (1996), los compuestos principales obtenidos de las hojas de *B. discolor*, *B. lupinoides*, *B. sousae* y *B. intermedia* fueron alcaloides, isoflavonoides, triterpenoides, derivados del ácido cinámico y estilipironas. Estas especies muestran un patrón típico de  $\alpha$ -pironas con citisina, anagirina y baptifolina. En las hojas de las primeras tres especies fueron encontrados alcaloides tipo omosanina. También analizó el contenido alcaloideo de *B. flava* y *B. vazquezii*, estas no presentaron  $\alpha$ -pironas, pero mostraron alcaloides tipo lupanina, lupaninas hidroxiladas y ésteres de alcaloides. En las hojas se halló el alcaloide esparteína. Salinas (1998) aisló de las raíces de *B. intermedia* los siguientes compuestos: 4'-hidroxidehidrokavaina aislado anteriormente de las raíces de *B. podalyrioides* por Reyes (1994), 3,5-diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol. Fabila (2001) aisló del extracto metanólico de las raíces de *B. intermedia* seis metabolitos secundarios:  $\beta$ -Sitosterol, (-)-maackian, neorautano, 3,5-diprenil-p-hidroxi-cinámato de metilo y 4-hidroxidehidrokavaina. La estilipirona hidrokavaina, también ha sido aislada con anterioridad de *B. podalyrioides* (Reyes, 1994) y de la misma planta *B. intermedia* por Salinas (1998).

### 3.12 Quimiotaxonomía

Es importante mencionar que el género *Brongniartia* forma parte de la tribu Brongniartiae incluida dentro de la subfamilia Papilionoideae. Se ha observado que los integrantes de esta subfamilia muestran una relación entre la presencia de ciertos compuestos isoflavonoides, las propiedades alexitéricas atribuidas y las actividades biológicas reportadas (Dewick, 1988). De acuerdo con Ingham (1981) y Reyes *et al.* (1992) un tipo de compuestos derivados de los isoflavonoides denominados pterocarpanos tienen una distribución tribal y subtribal muy precisa, a su vez estos compuestos se mencionan como los posibles causantes del efecto alexiviperino; principalmente cinco tribus de la subfamilia Papilionoideae (Desmodiidae, Dalbergiidae, Sophoreae, Phaseolae y Brongniartiae) son conocidas por sintetizar este mismo tipo de compuestos y varias especies son consideradas alexitéricas por la medicina tradicional (Reyes, 1994). Un ejemplo de estas similitudes se encuentra en las (-)-cabenegrinas A-I y A-II, compuestos pterocarpanos aislados de otro miembro de Papilionoideae, *Harpalyce brasiliensis*, que en un principio se identificaron en un preparado antiofídico llamado “específico Pessoa” en el noreste brasileño. Estos compuestos guardan una estrecha semejanza desde el punto de vista químico y biológico con otro pterocarpano denominado (-)-edunol compuesto aislado de *Brongniartia podalyrioides* y el coumestano wedelolactona aislado de *Eclipta prostrata* (Figura 8). Los cuatro compuestos mostraron efecto protector contra el veneno de crotálicos. Sus estructuras químicas presentan varias de las características que Mors (1991) considera podrían ser relevantes para que converjan en las actividades biológicas que se les atribuyen, estas similitudes son: un esqueleto isoflavonoide, funcionalidad dioxigenada y naturaleza ácida; además todos poseen rotación óptica negativa indicativa de la configuración S en los carbonos quirales 6a y 11a. La diferencia más relevante entre los tres compuestos pterocarpanos es la hidroxilación del sustituyente isoprenilo y por la posición en que éste se inserta al esqueleto principal (Breytenbach *et al.*, 1982).

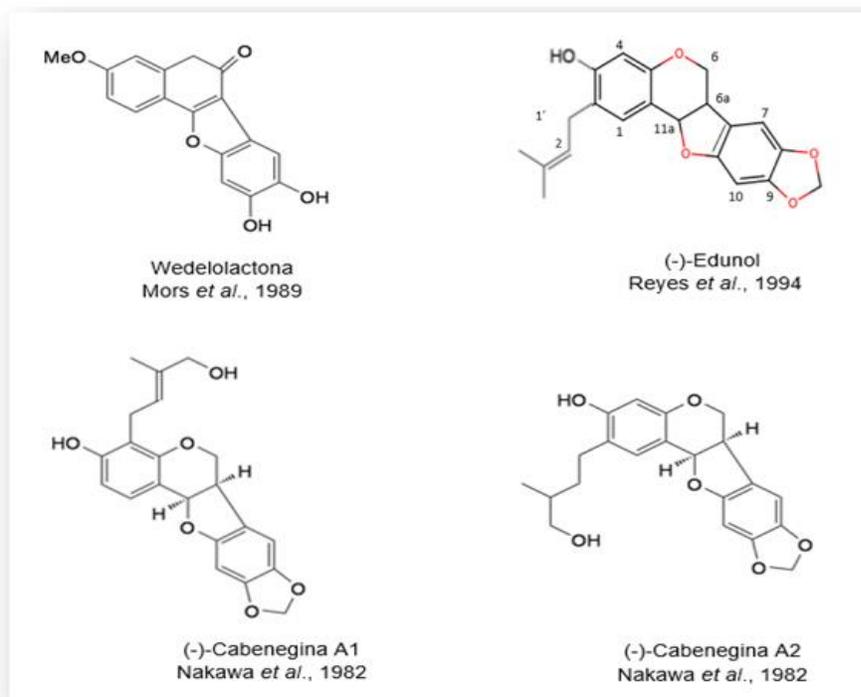


Figura 8. Estructura de algunos compuestos alexiviperinos pertenecientes a la subfamilia Papilionoideae.

De acuerdo con el uso en la medicina tradicional contra la mordedura de serpiente y las características que se le atribuyen a las plantas, resulta de interés primordial el estudio de los principios activos, para la ayuda en la terapia a poblaciones rurales.

## 4 JUSTIFICACION

La presente investigación forma parte de la iniciativa de buscar recursos e información para el tratamiento de la mordedura de serpiente venenosa y justificar científicamente el uso de plantas que puedan adyugar la acción de los antivenenos o fungir como una opción para aquellas personas que desarrollan hipersensibilidad frente a los faboterápicos. Además pretende aportar mediante la fitoquímica una base para determinar qué tipo de compuestos tienen potencial efecto sobre las manifestaciones locales especialmente hemorragia e inflamación del veneno de serpiente, para contribuir en la búsqueda de inhibidores que permitan mejorar la terapia antiofídica.

## 5 HIPOTESIS

Los extractos y compuestos extraídos de las plantas *Brongniartia montalvoana* y *Brongniartia intermedia* tendrán actividad contra la hemorragia local ocasionada por el veneno de la serpiente *Crotalus ruber lucasensis* en el modelo de hemorragia inducida en piel de ratón. A su vez los extractos y compuestos de ambas plantas presentarán actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación en oreja de ratón y mieloperoxidasa.

## 6 OBJETIVOS

**General:** Examinar *in vivo* (ratones) la actividad antihemorrágica y antiinflamatoria de los extractos y compuestos de dos especies del género *Brongniartia*.

- Determinar el potencial efecto local antihemorrágico de extractos y compuestos de *Brongniartia montalvoana* y *Brongniartia intermedia* ocasionados por el veneno de la serpiente *Crotalus ruber lucasensis*.
- Aislar e identificar algunos de los principales compuestos de uno de los extractos activos.
- Determinar si los extractos de ambas especies y alguno de los compuestos aislados poseen propiedades antiinflamatorias.

## 7. METODOLOGIA

La estrategia experimental se muestra a continuación en la Figura 9.

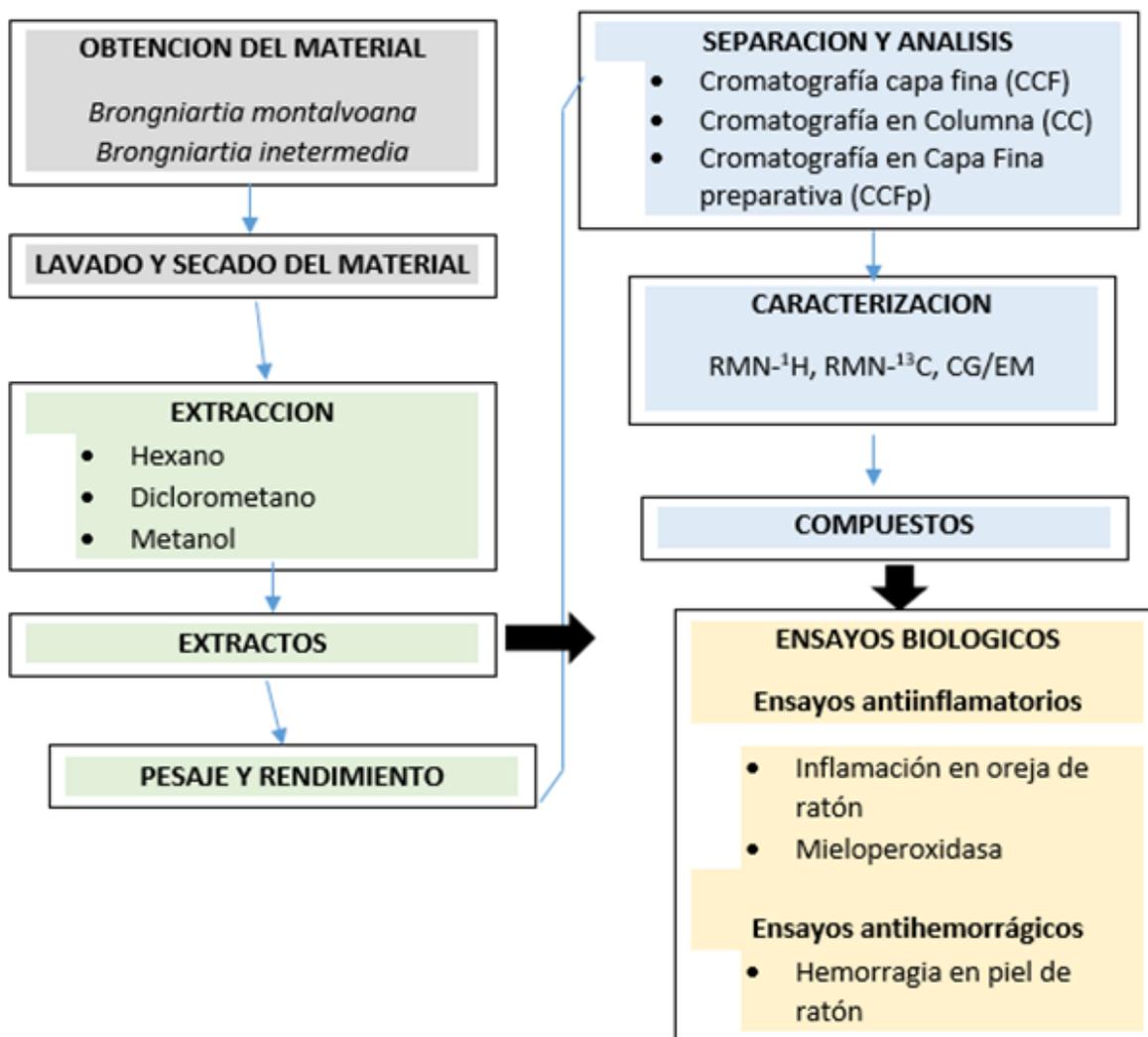


Figura 9. Estrategia experimental empleada en el presente trabajo

### 7.1 Colecta de *B. intermedia*

Se realizó una recolecta de *Brongniartia intermedia* el día 11 de Julio del 2017, en el cerro de Tetzcotzinco en la localidad de San Miguel Tlaixpan, Texcoco, que se encuentra en las coordenadas 98°49'05" longitud Oeste y 19°29'46" latitud Norte, en la parte más occidental de la Sierra del Tláloc, el lugar presenta vegetación perturbada, pudiéndose distinguir principalmente bosque de encino, matorral

xerófilo y pastizal, el clima corresponde a templado y subhúmedo con lluvias en verano.

Se colectó e identificó un ejemplar de 1.8 m de altura con hojas, tallo, flores y raíz, se cortó en el sitio separando las ramas que poseían flores colocándolas en una prensa botánica para posteriormente seleccionar aquellas que se pudieran incorporar a herbario; la raíz fue separada, se limpió y lavó con abundante agua para retirar insectos, polvo y cualquier suciedad que pudiese traer del campo, posteriormente se herborizó por un periodo de 12 días al sol para eliminar la humedad que pudiese contener, con el fin de evitar su contaminación por hongos o microorganismos y finalmente se cortó en trozos pequeños para poder hacer el procesamiento fitoquímico (Figura 10)



Figura 10. Colecta de *Brongniartia intermedia* kunth. (Villanueva-Solis I.) A) Vista general del arbusto. B) Acercamiento de las flores. C) Raíz leñosa. D) cortes de la raíz para su procesamiento (inferior)

Las hojas de la planta se separaron para poder realizar una extracción de compuestos alcaloideos, ya que de acuerdo con Greinwald (1996) varias plantas dentro del género los poseen en abundancia, el análisis de identificación de los alcaloides se realizó en el LANCIC (Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural).

El ejemplar fue seleccionado y depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México (UNAM) con el número de registro 0163568 y una ficha de colecta con la información mostrada en la Figura 11.

HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA U.N.A.M.		
Nombre científico: <u>Brongniartia intermedia</u>		
Familia: <u>Fabaceae</u>		
Localidad: <u>Cerro Texcotzingo en los Baños de Netzahualcōyotl a 4 Km. al E de Texcoco al S del Pueblo de Sn. Nicolás</u>		
Altitud: <u>2270 m.s.n.m.</u>	Mun. <u>Texcoco</u>	Coordenadas: <u>19.497205, -98.817560</u>
Tipo de Vegetación: <u>Perturbada</u>	Prim ( )	Sec (X)
Abundancia: <u>medianamente abundante</u>	Tamaño: <u>1.8m</u>	
Añual (X)	Perenne ( )	Otros datos
Descripción: <u>Arbusto erguido de 50cm a 2.5m de alto, flores papilionadas color rojo violáceo, fruto legumbre estipitada y aplanada</u>		
Usos: <u>Uso contra mordeduras de serpiente</u>		
Colector: <u>Israel Villanueva Solís</u>	Fechas col. <u>11/07/2017</u>	
Determinó: <u>Israel Villanueva Solís</u>		

Figura 11. Ficha de colecta de *Brongniartia intermedia* kunth.

## 7.2 Obtención del material de *B. montalvoana*

El material empleado de *B. montalvoana* provino de una colecta realizada en la cuenca del Río Balsas por el Dr. Oscar Dorado (Estación Biológica El Limón dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla) y donado al Dr. Ricardo Reyes del I.Q. UNAM. El material consistió principalmente de raíz, la cual también se limpió y lavó para posteriormente poner a secar al sol por un periodo de cinco días, finalmente se cortó en pedazos para su procesamiento fitoquímico (Figura 12).



Figura 12. A) Raíz leñosa de *Brongniartia montalvoana*. B) Cortes de raíz.

## 7.3 FITOQUIMICA

### 7.3.1 Extracción

La elaboración de los extractos de ambas plantas se enfocó en la raíz, que es la principal parte usada en los reportes de etnomedicina, ésta se trituro con el fin de que el solvente tuviera mayor superficie de contacto con el material y se extrajera mejor. El peso seco del material donado de *B. montalvoana* fue de 500 g y el de la colecta de *B. intermedia* fue de 3.215 kg, ambas muestras se maceraron en disolventes no polares y posteriormente en polares para después ser procesados y analizados con el fin de obtener algún compuesto. En el caso de *B. montalvoana* se utilizaron los disolventes: hexano, diclorometano y metanol, cubriendo en su totalidad el material y dejando un máximo de dos semanas en maceración cada uno.

Para *B. intermedia* únicamente se ocupó diclorometano y metanol. Los extractos fueron concentrados a presión reducida en un evaporador rotatorio, repitiendo este procedimiento varias veces y filtrando cada vez por medio de papel filtro. Cada extracto se recuperó etiquetó y colocó en una cámara de vacío durante una semana a 30°C para eliminar el excedente de disolvente, posteriormente se pesó con el fin de obtener el rendimiento. El extracto hexánico de *B. montalvoana* se envió a Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG/EM).

### 7.3.2 Análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

De cada extracto de diclorometano se tomaron 5 mg y se disolvieron en 1 mL de disolvente para poder aplicarlos a los cromatofolios de gel de sílice con indicador de fluorescencia UV, se aplicó 5 µl sobre el cromatofolio, usando un capilar graduado. La fase móvil se determinó para cada extracto con el fin de evaluar en que sistema se presentaba una mejor separación de los componentes, en general se observó que el sistema de elusión más adecuado fue diclorometano/ metanol 8:2. Después de eluir, los cromatofolios se colocaron bajo luz ultravioleta a una longitud de onda corta de 254nm y de onda larga de 365 nm para observar el patrón de resolución de las placas, finalmente el revelado permanente se hizo con sulfato cérico 1% en ácido sulfúrico 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), método general para compuestos orgánicos, exponiéndolo a calor en una parrilla de calentamiento a 90°C.

### 7.3.3 Fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) de raíz de *B. montalvoana*

El extracto de diclorometano obtenido de la raíz de *B. intermedia*, se procesó mediante CC tomando 4 g empacados en una columna de vidrio con 80 g de gel de sílice malla de 60. Como fase móvil se utilizó inicialmente el sistema hexano: diclorometano 9:1 con aumentos graduales de diclorometano hasta la fracción 85 donde el sistema se modificó a diclorometano/acetona 9:1 aumentando progresivamente la cantidad de acetona y finalmente en la fracción 139 se modificó al sistema acetato de etilo/metanol 9:1 aumentando la cantidad de metanol. Las 206 fracciones obtenidas fueron concentradas en un evaporador rotatorio y analizadas por CCF fase normal, después se observaron a luz UV de 254 y 365 nm y finalmente se revelaron con sulfato cérico. De acuerdo con su similitud cromatográfica las fracciones se agruparon como se muestra en la Figura 13. La fracción 1 de la columna se envió para su análisis por CG/EM por tener en CCF un perfil cromatográfico intenso.

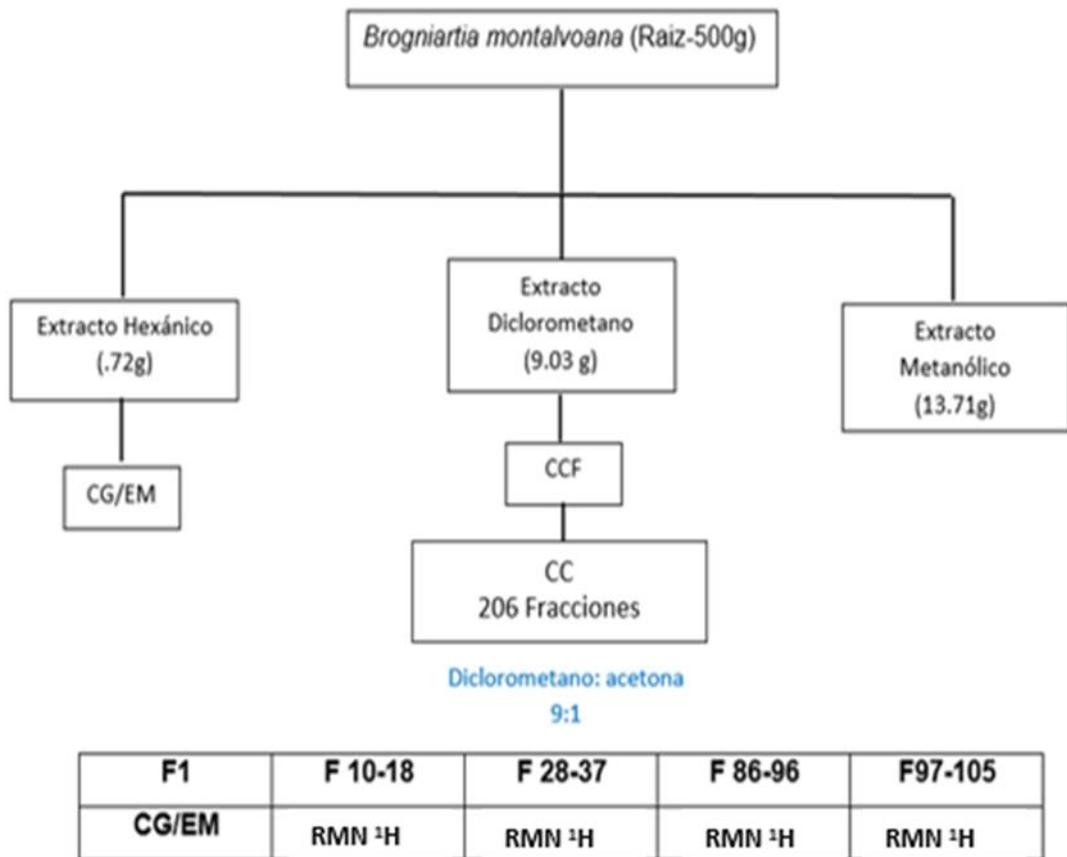


Figura 13. Metodología seguida para el análisis fitoquímico de *Brongniartia montalvoana*

### 7.3.4 Fraccionamiento por CC de raíz de *B. intermedia*

Del extracto diclorometanico de *B. intermedia* se tomaron 15 g para hacer una columna de separación que nos permitiera fraccionarlo para obtener mezclas más trabajables de los compuestos observados en capa fina, para ello se utilizó 200 g de gel de sílice fase normal malla de 35-70, el extracto se mezcló con 10g de celita para facilitar su empaque en la columna ya que presentaba una consistencia resinosa. Al principio el sistema de elución empleado fue de hexano/diclorometano 9:1; sin embargo al ir adicionando cantidades mayores de diclorometano, en la fracción 10 se formó una cera que impedía eluir correctamente la columna, por lo que se re-empaco con un nuevo sistema de elución que evitara el diclorometano y permitiera el correcto avance, este sistema fue hexano/acetato de etilo 1:1 y se consideró la primera fracción de esta nueva columna como la fracción 11.

La columna se eluyó inicialmente con 150 mL de 50% hexano (Hex) y 50% acetato de etilo (AcOEt), posteriormente se fue aumentando la cantidad de AcOEt hasta llegar al 100%. Las 84 fracciones obtenidas fueron posteriormente concentradas en un evaporador rotatorio y analizadas por CCF fase normal, después se observaron a luz UV de 254 y 365 nm y finalmente se revelaron con sulfato cérico. De acuerdo con su similitud cromatográfica las fracciones se agruparon como se muestra en la Figura 14.

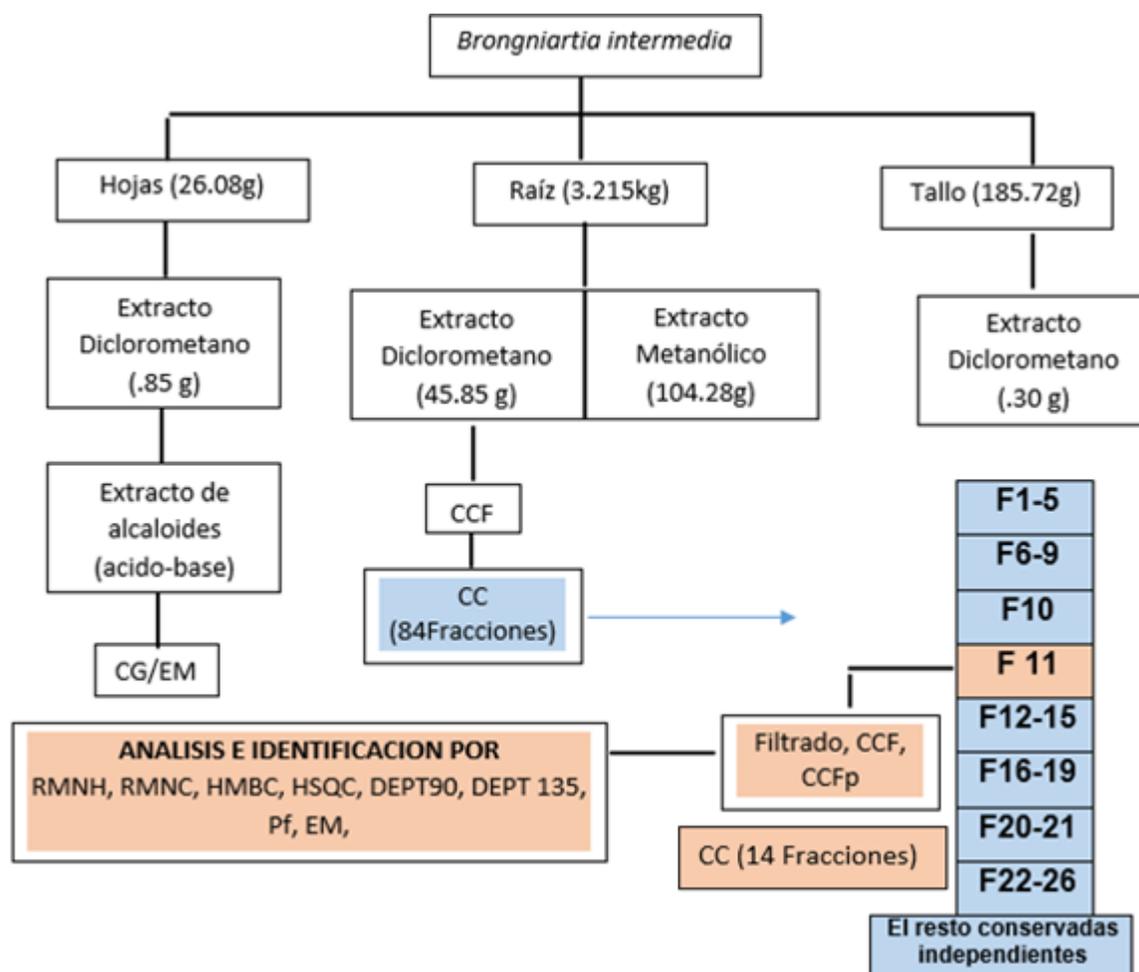


Figura 14. Metodología seguida para la fitoquímica de *Brongniartia intermedia*

La fracción 11 de la columna presentó un perfil cromatográfico interesante, por lo cual se le agregó MeOH, se filtró al vacío para quitar impurezas y se obtuvo un polvo blanco amarillento (PB) soluble en diclorometano a moderado calentamiento, el cual se monitoreó por CCF.

### 7.3.5 Cromatografía en Capa fina Preparativa (CCFp)

El polvo amarillo obtenido de la columna cromatográfica de *B. intermedia*, se sometió a la separación de sus componentes por CCFp para lo cual se empleó 70.7 mg del polvo aplicados sobre un cromatofolio con base de vidrio, gel de sílice de 20 X 20 cm. Se usó como fase móvil hexano/acetato de etilo 9:1, obteniendo seis bandas las cuales se rasparon de la placa con una espátula y se colocaron en viales diferentes. A continuación se filtró el gel de sílice con diclorometano en cada vial para recuperar los compuestos, a cada banda se le asignó una letra para su distinción (A, B, C, D, E y F) se analizaron por CCF y se revelaron con sulfato cérico. La banda C se envió a RMN <sup>1</sup>H (Resonancia Magnética de protón) y el espectro resultante se procesó por medio del software MestRe Nova versión 8.0.2 para calcular las integraciones y las constantes de acoplamiento con el fin de proponer la estructura del compuesto aislado.

### 7.3.6 CC de la fracción 11

Una vez determinando el compuesto aislado de la fracción 11, se realizó una columna cromatográfica para obtener cantidades adicionales, para ello se utilizó una columna de vidrio de 250 mL, se agregó 21 g de gel de sílice malla 70:230 y 1.30 g de la fracción 11, el sistema de elusión empleado fue hexano/ acetato de etilo 9:1.

Se realizó CCF fase normal para observar que el perfil cromatográfico de las fracciones correspondiera al obtenido para el neorautano, se juntaron dichas fracciones y enseguida se formó un sólido amorfo blanco que fue filtrado posteriormente se analizó por RMN <sup>1</sup>H (LURMN-IQ-UNAM) y EM-DART(Espectrometría de Masas por Análisis Directo en Tiempo Real) se obtuvo su punto de fusión por medio un aparato Fisher, todo esto con el fin de confirmar su identidad y asegurar que fuese el compuesto de interés; Posteriormente se realizó una búsqueda bibliográfica en el Dictionary of Natural Products para recabar información sobre el compuesto. Comprobada la presencia de neorautano, se

completó su análisis por los siguientes métodos espectroscópicos: RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90, DEPT 135, HSQC y HMBC.

### **7.3.7 Extracción alcaloidea de hojas de *B. intermedia***

Se realizó una extracción de alcaloides ácido-base (Figura 15) del extracto de diclorometano de las hojas de *B. intermedia* siguiendo lo reportado por Centeno-Betanzos (2014) de la siguiente forma: al extracto de diclorometano (0.85 g) se le agregó una solución acuosa de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 2.5% y la mezcla se colocó en un baño sonicador por 10 min. Este proceso se repitió varias veces hasta que el extracto estuviera disuelto completamente. Posteriormente el extracto se puso en un embudo de separación y se le agregó 5 ml de éter, se tapó y se agitó suavemente, formándose así dos fases. La fase inferior se denominó fase acuosa (FA1) y la superior fase orgánica (FO1), esta última se recogió en un matraz, este proceso se realizó seis veces, con el propósito de extraer sustancias neutras y compuestos apolares. A la FA1 se le agregó 1 mL de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) hasta llevarlo a un pH de 9 o 10 (monitoreando con tiras de pH) y enseguida se le agregó 5 ml de AcOEt, se agitó y se obtuvo nuevamente dos fases. La fase orgánica superior (FO2), que es la más importante del proceso debido a que es en esta donde se extrae la mayor cantidad de alcaloides, se recogió en un matraz, el proceso se realizó varias veces hasta que la FO2 se observara transparente.

Por último, a la fase acuosa inferior (FA2), se le agregó 5 ml de una mezcla de AcOEt/ MeOH 3:1, se agitó y se formaron dos fases. La fase orgánica superior (FO3) se recogió en un matraz, el proceso se repitió varias veces para extraer el resto de alcaloides que fuesen más polares. Al finalizar la extracción, las fracciones alcaloideas (FO2 y FO3) fueron concentradas en un evaporador rotatorio y se secaron en una cámara de vacío. De la fracción alcaloidea obtenida de FO2, se tomó una muestra para analizarla por CG/EM (LANCIC-IQ-UNAM).

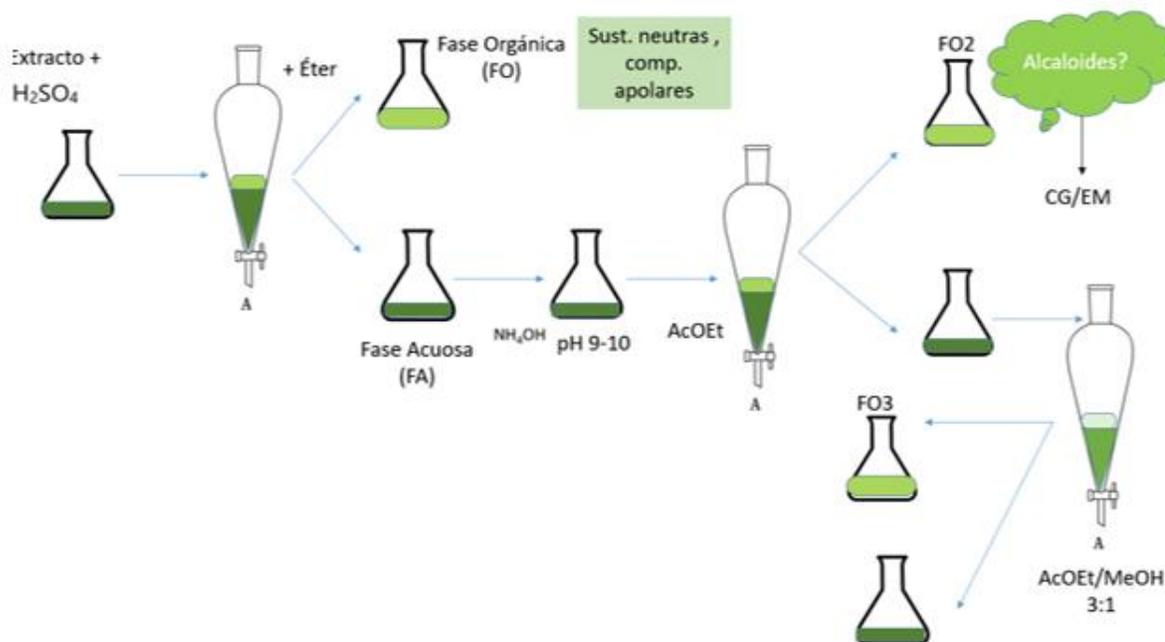


Figura 15. Extracción ácido-base de alcaloides (Villanueva-Solis, 2018)

## 7.4 Ensayos Biológicos

### 7.4.1 Pruebas antihemorrágicas

#### 7.4.1.1 Obtención y procesado del veneno

El veneno utilizado en las pruebas biológicas realizadas se obtuvo como parte de una estancia en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz Baja California Sur, donde se extrajo por ordeña manual asistida el veneno de varios ejemplares de *Crotalus ruber lucasensis*, capturados por el personal del CIBNOR (Arnaud-Franco *et al*, 2018). Para realizar la extracción se usó un frasco para muestras cubierto con parafilm, con el fin de brindarles una superficie donde morder a las serpientes, este frasco se colocó en un soporte universal donde estuviera fijo, posteriormente se aseguró con tubos herpetológicos a cada serpiente

de las que se extrajo el veneno, la cabeza se dirigía por medio de pinzas largas hacia el frasco, hasta que la serpiente depositaba el veneno (Figura 16)

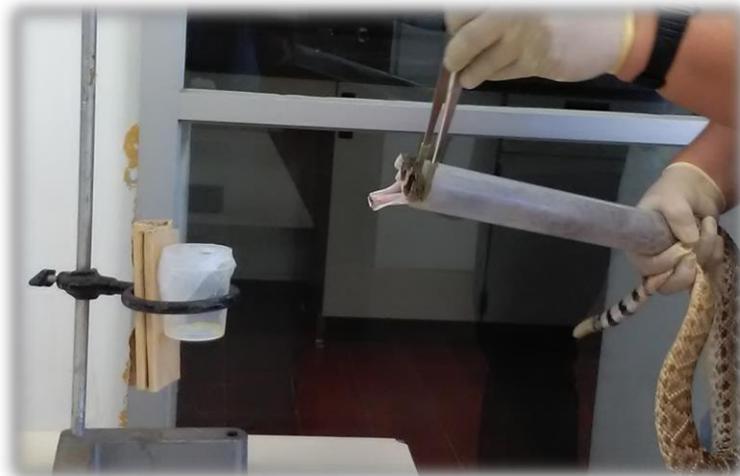


Figura 16. Método de extracción manual asistida

Inmediatamente después de la extracción, el veneno se pasó por medio de una pipeta a tubos para congelación herméticos, llenándolos dos terceras partes de su capacidad y rápidamente se sumergieron en nitrógeno líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$  por tres segundos, finalmente se llevaron a liofilizar al laboratorio de Inmunogenómica Marina del CIBNOR para su conservación y transporte. El veneno ya liofilizado se guardó en refrigeración a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El veneno extraído de todas las serpientes se mezcló haciendo un pool de venenos (Anexo 2) debidamente etiquetado, que fue utilizado en las pruebas realizadas. En condiciones estériles y bajo una campana de extracción, la mezcla de veneno fue diluida en solución salina isotónica a una concentración de 10 mg/mL denominada como solución “Stock”, de la cual, se preparó la dosis para las pruebas.

#### **7.4.1.2 Modelo de Hemorragia en piel de ratón**

##### **7.4.1.2.1 Sujetos de estudio (modelo murino)**

Se emplearon ratones de la cepa CD-1 (ICR) producidos y mantenidos en el “Centro UNAM ENVIGO de producción de Animales de Laboratorio”, su peso fue de 20 a 25 g y de sexo indistinto. Las condiciones en las que se mantuvieron cumplieron las normas éticas y reglamentos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales

de Laboratorio proporcionándoles alimento sólido (pellet) y agua limpia mediante bebederos de gravedad, se colocaron en cajas especiales de plástico o acrílico transparente, respetando el número de individuos por unidad para evitar hacinamiento, la temperatura a la que permanecieron fue de 20-25° y humedad relativa de 50-60%.

El manejo de los animales de estudio se realizó de acuerdo a las especificaciones de Cordero-Tapia (2017) mediante el uso de tubos falcon de 50 ml modificados con aberturas en la punta inferior y al costado para mejor manejo del ratón, de tal manera que se estresara menos y fuera más seguro para quien manipula.

#### **7.4.1.2.2 Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)**

Las pruebas mediante la técnica de halo hemorrágico en piel de ratón que se describen a continuación se realizaron en el área de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM en colaboración con el M. en C. Fernando Pozas, del CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) y estuvieron avaladas por el comité de bioética mediante el número de aprobación CICUAL-IQ-001-18.

La dosis hemorrágica es definida como la dosis mínima de veneno capaz de producir una lesión hemorrágica subcutánea con un diámetro de 10 mm, en un tiempo de dos horas. La dosis hemorrágica considerada en este trabajo se tomó con base en el trabajo de Arnaud-Franco *et al.* (2018) reportada para *Crotalus ruber lucasensis* que corresponde a 1.68 µg obtenida mediante el método modificado de Kondo *et al.* (1960) sin embargo se realizó la prueba como parte de la colaboración. Se administraron intradérmicamente diferentes dosis de veneno (4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µl/ratón) en la piel de la región dorsal de ratones cepa CDI/ICR en un volumen de 50 µl. (Figura 17A).

Dos horas después de la inyección se sacrifica el ratón, se les retira la piel (Figura 17B), y se estima el diámetro de las manchas hemorrágicas, el cual se calcula mediante el promedio de dos mediciones, realizadas con vernier digital mide con vernier digital (Figura 17C), (una vertical y otra horizontal) trazadas por los cuatro

puntos más externos del halo hemorrágico. Los resultados de esta prueba se pueden encontrar en Pozas-Ocampo (2019).

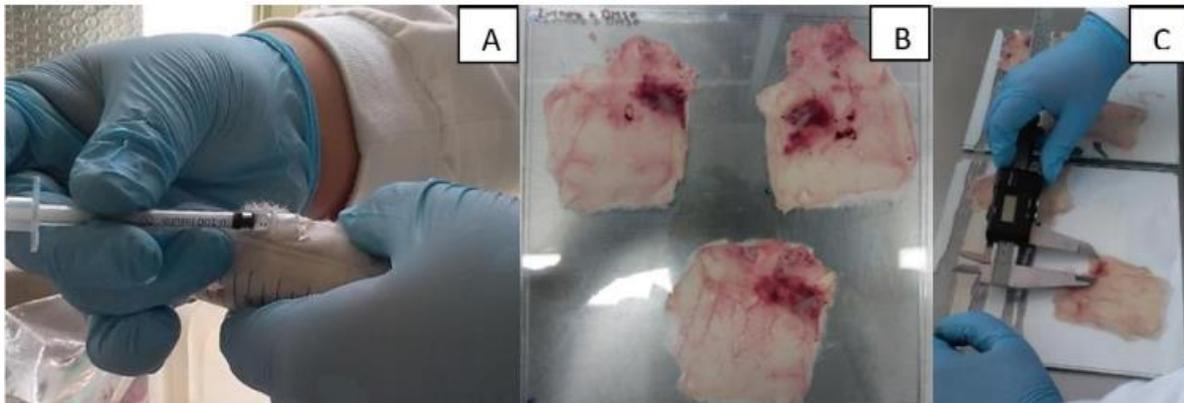


Figura 17. Procedimiento para la técnica del halo hemorrágico de Kondo (1960) A. Inyección intradérmica dorsal. B. pieles colocadas entre los vidrios. C. Medición del halo hemorrágico

#### 7.4.1.3 Prueba preliminar para ajuste de la Dosis de reto

El valor utilizado generalmente como dosis de reto para pruebas con extractos de plantas corresponde a 10 DHM (diez veces el valor de la dosis hemorrágica mínima) éste valor ha sido usado especialmente para serpientes del género *Bothrops* (Castro *et al.*, 1999). Estas poseen una DHM mayor a la reportada para nuestro caso, lo cual indica que el veneno de *Bothrops* es menos hemotóxico. El motivo de esta prueba fue ajustar el valor de la DHM con el veneno de *Crotalus ruber* y verificar si con el valor usado para *Bothrops* se observaba únicamente el efecto deseado (hemorragia) o algún otro efecto sistémico (convulsiones, necrosis, fallo respiratorio etc.) que pudiese causar mayor error en la toma de datos de la hemorragia, para ello se emplearon tres grupos de prueba, cada grupo con una n=3 ratones y se evaluaron tres valores de DHM, 2DHM, 5DHM y 10DHM observando el comportamiento nociceptivo, interpretado por reacciones como la piloerección, la acatisia (incapacidad de mantenerse quieto), comezón entre otras, en el transcurso de las dos horas, también se observó la hemorragia causada transcurrido ese tiempo.

#### 7.4.1.4 Pruebas de potencial antihemorrágico

Para las pruebas de neutralización se decidió utilizar los extractos de diclorometano y metanol de la raíz de ambas plantas. De acuerdo con Castro *et al.* (1999) una cantidad constante de veneno se incubó con una cantidad de extracto a una razón veneno: extracto de 1:50 (peso: peso) manteniendo un volumen total constante, por lo cual de cada muestra de extracto se empleó 0.168mg para mantener dicha razón. Se preparó como control negativo de la inhibición veneno con dimetilsulfoxido (DMSO-vehículo del extracto) y solución salina al 0.9% Para este experimento se utilizaron cinco grupos con n=3 (tratamientos) y un grupo con una n=6 (control-veneno)

Para los tratamientos se reconstituyó el veneno con solución salina al 0.9% y los extractos se disolvieron con DMSO, posteriormente se mezclaron e incubaron a baño María aproximadamente a 37°C durante 15 a 20 minutos (Figura 18) y de cada mezcla se inyectaron intradérmicamente, con un volumen de administración de 100  $\mu$ l.



Figura 18. Incubación de la mezcla veneno/extracto en baño María

Transcurridas las dos horas después de la administración se procedió a sacrificar a los ratones por dislocación cervical y se les extrajo la piel, preparándola para la medición de acuerdo con las modificaciones de Cordero (com. pers., 2018), que consiste en colocar las pieles entre dos hojas de vidrio de las mismas dimensiones, extendiéndolas lo más posible y dejando la piel presionada entre ambas superficies.

La medición se realizó con vernier digital marcando dos puntos extremos verticales y dos puntos extremos horizontales perpendiculares entre sí, evitando trazos

diagonales, a las mediciones hechas (vertical y horizontal) se les sacó promedio para obtener el diámetro del halo hemorrágico (Anexo 3), estos datos se analizaron por ANOVA de una sola vía y una prueba *ad hoc* de Tukey mediante el programa Real Statistics.

Posterior a este procedimiento se ocupó el programa de procesamiento de imagen digital Image J, mediante el cual se obtuvo el área transformada a pixeles (Figura 19) para cada halo hemorrágico con el fin de comparar si los datos obtenidos por el método de cuatro puntos presentaban un comportamiento similar con el de áreas que ocupa muchos más puntos. De igual manera se analizaron por ANOVA de una sola vía y la prueba de significancia de tukey con el programa estadístico Real Statics.



Figura 19. Delimitación de las áreas hemorrágicas en piel de ratón por medio del software Image J.

#### 7.4.2 Efecto antiinflamatorio en el modelo de TPA

El TPA o de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato es un potente promotor de tumores y proinflamatorio. Su aplicación tópica induce inflamación en la piel y una respuesta hiperproliferativa en los animales. La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria, actúa por la activación de la proteína quinasa C (PKC) que desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias, activando funciones celulares y de proliferación como la fosfolipasa A2 (PLA) y el incremento de radicales libres (Patel 2012). En el presente ensayo se usó para inducir edema en orejas de ratón, lo que promueve el reclutamiento de neutrófilos y el consecuente aumento de peso de la oreja inflamada. Para el cernimiento de la actividad de los diferentes extractos de éste modelo (Figura 20) primero se anestesiaron con pentobarbital administrado por vía intraperitoneal cinco grupos de ratones (cuatro extractos y control) con n=3. Posteriormente en la oreja derecha se les aplicó con una jeringa de HPLC vía tópica, 10 µL de una solución etanólica de TPA mientras que en la oreja izquierda solo etanol (10 µL). 10 minutos después en la oreja izquierda se aplicaron 20 µL de vehículo (solvente en el que se diluye cada extracto), mientras que en la oreja derecha se aplicó 20 µL de las muestras a analizar que fueron los extractos de diclorometano y metanólico tanto de *B. montalvoana* como *B. intermedia* a una dosis de 1mg/oreja, dosis standard para la prueba que pudiera disolverse en el vehículo y administrarse por esa vía. El control negativo de inhibición consistió en orejas con TPA sin tratamiento y para el control positivo se utilizó indometacina a 1 µmol/oreja. El compuesto se analizó por aparte con éste mismo modelo, para lo cual se empleó un grupo con n=3 y el control también con=3.

Después de cuatro horas, que es cuando el TPA causa su máxima inflamación, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se cortaron los lóbulos de las orejas con un sacabocados (Figura 19), se colocaron en tubos eppendorf (previamente pesados) y se pesó la diferencia de los tubos. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía y posterior a este una prueba de Dunnet.

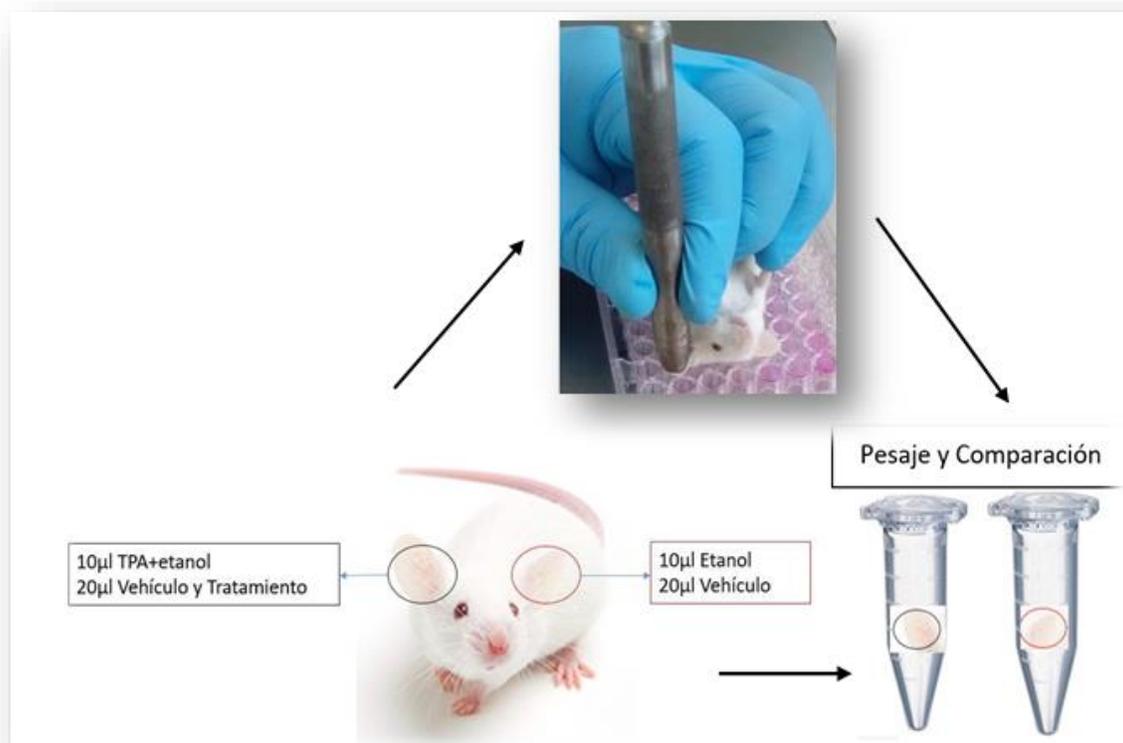


Figura 20. Modelo de inflamación en oreja de ratón por TPA

El mismo método de inflamación por TPA, también se empleó para determinar la curva dosis-respuesta del extracto metanólico de *B. montalvoana* que fue el que presentó mayor actividad en la prueba anterior, además se calculó el valor de la IC<sub>50</sub> mediante regresión lineal por el programa Origin, para ello se utilizaron cinco grupos de ratones con n=5 correspondientes a cuatro concentraciones: 0.032, 0.1, 0.32, 1mg/oreja y un control negativo (TPA sin tratamiento); La cantidad de extracto usado fueron 10 mg.

### 7.4.3 Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima localizada en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), cuya función es generar ácido hipocloroso un agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos. Su valoración permite obtener una estimación semicuantitativa de la infiltración celular producida en una respuesta inflamatoria, pudiéndose emplear como marcador del contenido de neutrófilos, debido a su abundancia en estas células (Suzuki *et al.*, 1983). En el ensayo a medida que el edema se desarrolla, las células inflamatorias se acumulan en la microcirculación de la oreja y migran hacia el tejido. Estas células suelen ser, mayoritariamente, polimorfonucleares al principio de la inflamación, para dar paso posteriormente a los monocitos. La actividad de la MPO en el tejido se midió en las biopsias tomadas de las orejas (recuperadas del experimento de TPA) cuatro horas después de la administración de TPA utilizando un método adaptado de Bradley y Alabama (1982) y Suzuki y Alabama. (1983). Cada biopsia de oreja de ratón se colocó en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 80 mM, pH 5.4, que contenía 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB). La muestra se homogeneizó durante 30 s a 4 °C con un homogeneizador de muestras pequeñas de tejido Tearor Homogeneizer. El homogeneizado se congeló y descongeló a temperatura ambiente tres veces, se sonicaron durante 20 segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se vertieron por cuadruplicado 10 µl del sobrenadante resultante en una microplaca de 96 pocillos y se añadieron 180 µl de PBS 80 mM (pH 5.4) sin HTAB. La microplaca se calentó a 37 °C y luego se añadieron a cada pocillo 20 µl de peróxido de hidrógeno al 0,017%. Para la actividad de la MPO, se agregaron 20 µL de 18.4 mM 3,3',5,5', tetrametilbencidina en dimetilformamida acuosa al 50% para iniciar la reacción. Las placas de microtitulación se incubaron a 37 ° C durante 5 min. La reacción se detuvo con 20 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. La actividad de la enzima MPO se evaluó colorimétricamente utilizando un lector de microplacas BioTek a una longitud de onda de absorbancia de 405 nm. La actividad de la MPO se expresó como densidad óptica (OD) por biopsia.

## 8 Resultados

### 8.1 Fitoquímica

#### 8.1.1 Rendimientos

Los rendimientos de los extractos se obtuvieron mediante la fórmula de la Figura 21, una vez que estaban libres de disolventes y se muestran en la Tabla 2. Donde se observa que el mayor rendimiento se obtuvo en el extracto metanólico de la raíz de ambas plantas, mientras que los de menor rendimiento fueron el extracto hexánico de la raíz de *B. montalvoana* y el extracto de diclorometano de las hojas de *B. intermedia*

$$\frac{100 * \text{Gramos de extracto obtenido}}{\text{Gramos de material vegetal usado}} = \% \text{ de rendimiento}$$

Figura 21. Fórmula para sacar el rendimiento de los extractos expresado en porcentaje

Tabla 2. Rendimientos de cada extracto con respecto al peso seco de cada planta

Especie	Parte	Peso seco (g)	Extracto	Peso (g)	% Rendimiento de acuerdo el peso seco
<i>Brongniartia montalvoana</i>	Raíz	500 g	Hexano	0.72g	0.144
			Diclorometano	9.03g	1.80
			Metanólico	13.71g	2.74
<i>Brongniartia intermedia</i>	Raíz	3215g	Diclorometano	45.85g	1.42
			Metanólico	104.28g	3.24
	Hojas	26.08g	Diclorometano	0.85g	3.25
			Metanol	2.17g	8.32
Tallo	185.72g	Diclorometano	0.30g	0.16	

Se muestran en rojo los extractos que fueron utilizados para las pruebas biológicas.

El análisis por CG/EM por Impacto Electronico (EI) reveló los compuestos mayoritarios presentes en el extracto hexánico de *Brongniartia montalvoana*, principalmente estigmastanos y lupeol que son triterpenos y sitosterol que es un fitoesterol común en las plantas (Figura 22)

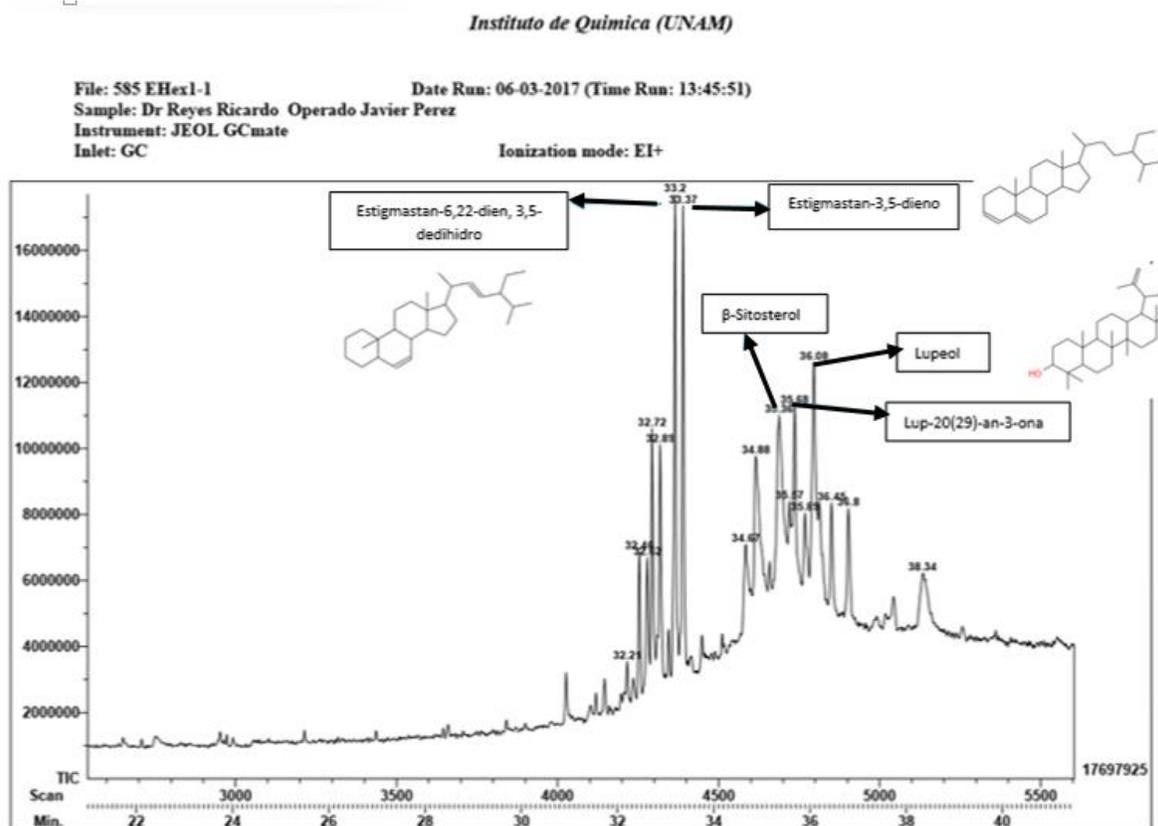


Figura 22. CG/EM del extracto hexánico de *B. montalvoana*. Abundancia: Estigmastan-6-22-dien.3,5-dehidro 17.2%;Estigmastan-3,5-dieno 15.2%;Lupeol 12%; Lup-20 (29)-an-3-ona 10.9%; $\beta$ -Sitosterol 10.8%.

### 8.1.2 Fraccionamiento por CC de la raíz de *B. montalvoana*

De la CC se obtuvieron 129 fracciones que se monitorearon por CCF como se muestra en la Figura 23. La fracción 1 se analizó por CG/EM por EI y se compararon los datos obtenidos con la base del NIST (National Institute of Standards and Technology) de la cual se obtuvieron principalmente ésteres de ácidos grasos como lo muestra la Figura 24 donde la mayor abundancia se observa para el ácido-9-metil éster dodecanoico.

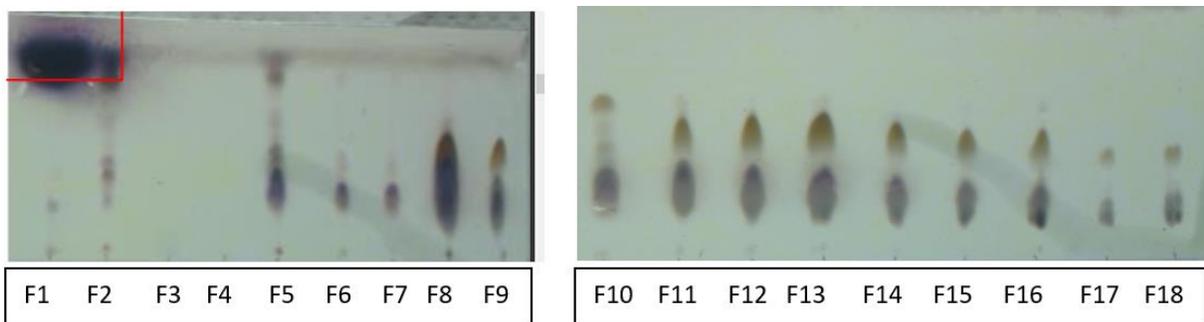


Figura 23. CCF de las fracciones 1-18 de la CC del extracto diclorometánico de la raíz de *Brongniartia montalvoana* revelado en con sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Sistema de elución Diclorometano/Hexano 75:25. Se marca en cuadro rojo la fracción 1 analizada por CG/EM.

Instituto de Química (UNAM)

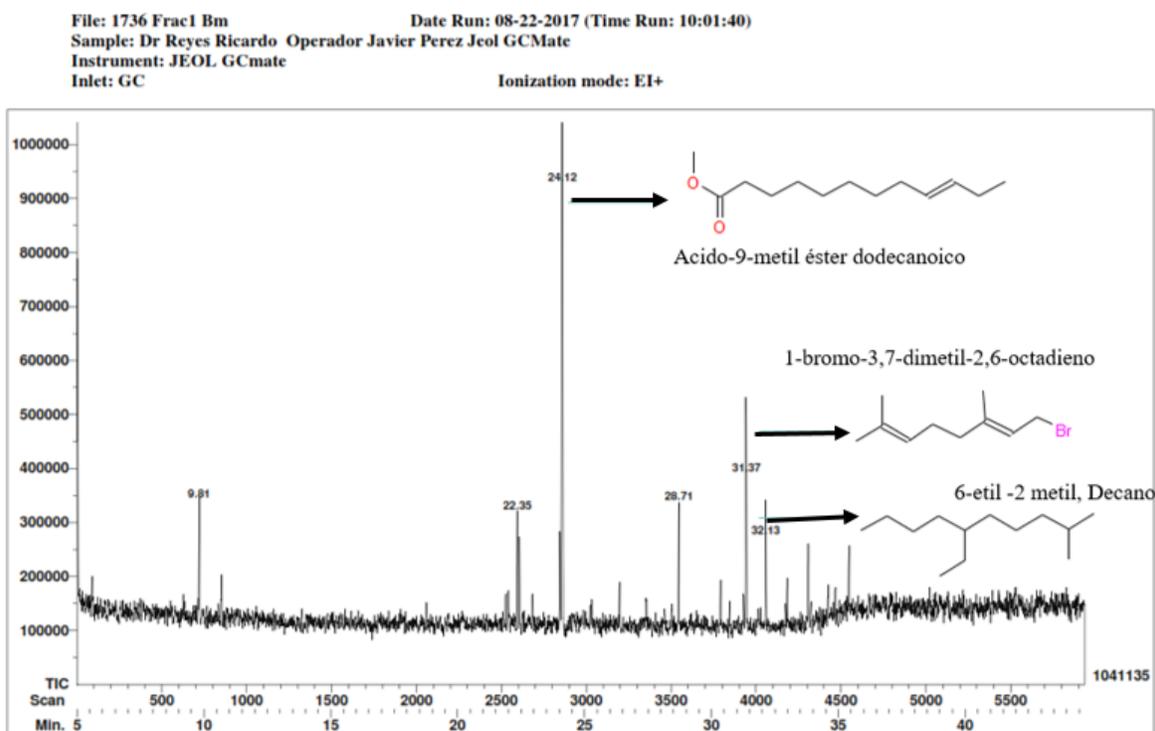


Figura 24. CG/EM de la Fracción 1 del Extracto diclorometano de *Brongniartia montalvoana*: Abundancia. Acido-9-metil éster dodecanoico 9.4%; 1-bromo-3,7-dimetil-2,6-octadieno 11.5%; 6-metil-2-metil, decano.

### 8.1.3 Fraccionamiento por CC de la raíz de *B. intermedia*

Se obtuvieron 84 fracciones monitoreadas por CCF, la fracción 11 (Figura 25) mostró un perfil interesante por lo que se decidió agregarle metanol (MeOH) para separar posibles compuestos que estuviesen mezclados, se filtró al vacío y se

obtuvo un polvo blanco (PB), las aguas madres donde se formó el PB al agregarles más MeOH formaron dos fases que se recogieron en un embudo de separación, una se denominó fase superior acuosa (FSA) y otra fase inferior oleosa (FIO), ambas fases y el polvo obtenido se analizaron por CCF como se muestra en la Figura 26 donde se observa que la banda enmarcada en rojo al revelar con sulfato cérico, es común en ambas fases y el PB, mientras que en UV de 365 nm no se observa esta banda.

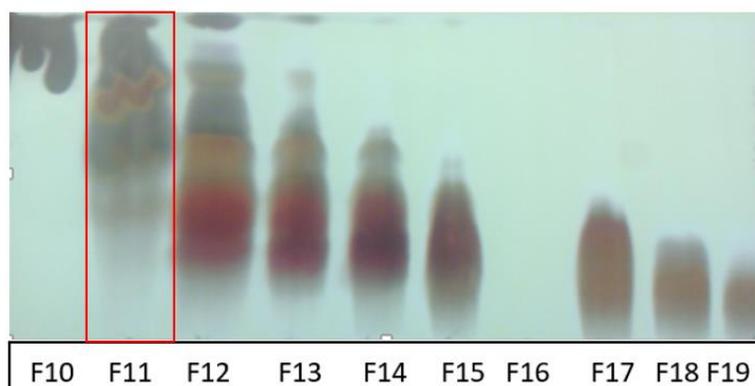


Figura 25. CCF de las fracciones 10-18 del extracto diclorometánico de la raíz de *B. intermedia* revelado en con sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Sistema de elución hexano/acetato de etilo 1:1. Se enmarca en rojo la fracción 11 de la que se obtuvo el polvo blanco.

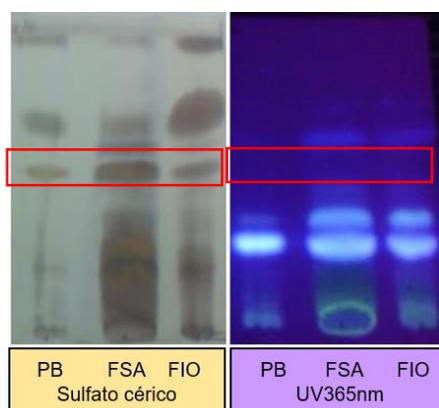


Figura 26. CCF de los productos de la fracción 11; polvo blanco (PB), fase superior acuosa (FSA) y fase inferior oleosa (FIO), revelado en con sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y observado a UV de 365nm. Sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se encierra en rojo compuesto de interés

Se observó un posible compuesto en el perfil correspondiente al PB por lo que se procesó por CCF de 2.5 cm X 10 cm para observar mejor la separación de la mezcla. La cromatoplaaca mostró claramente el perfil cromatográfico de la banda de interés con hexano/acetato de etilo 9:1. Se decidió separar la mezcla por fraccionamiento en CCFp con el fin de poder aislar algún compuesto, especialmente el correspondiente a la mancha intensa (Figura 27).

En la placa preparativa se alcanzaron a distinguir seis franjas intensas que se marcaron como A, B, C, D, E y F (Figura 28) estas franjas se rasparon de la placa para separar el compuesto de cada una y posteriormente se les hizo CCF.

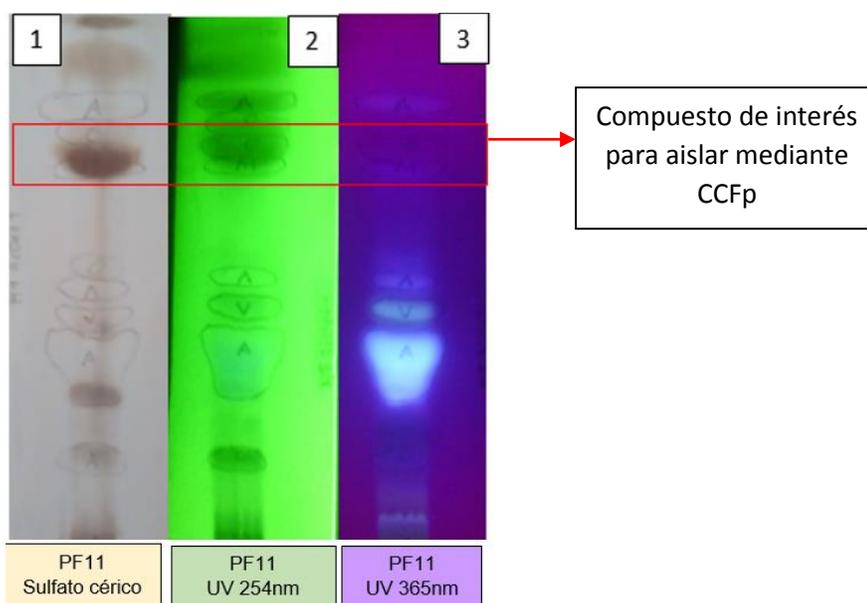


Figura 27. CCF del polvo obtenido de la fracción 11 del extracto diclorometánico de la raíz de *B. intermedia* revelado en con sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y observado a UV de 254 y 365nm. Sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se enmarca en rojo el compuesto de interés

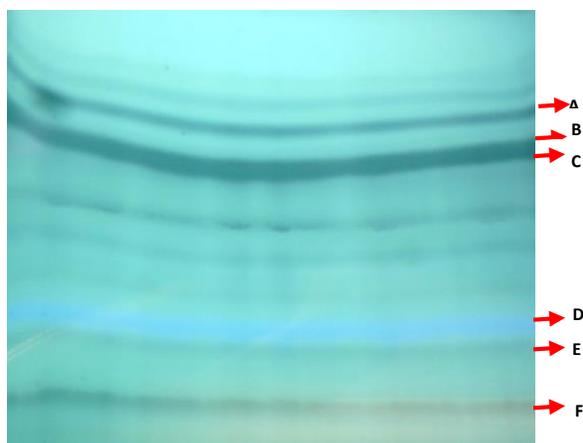


Figura 28. Placa Preparativa, Sistema de elución Hexano/Acetato de etilo 9:1. Extracto de diclorometano F-11 polvo filtrado revelada a UV 365nm

#### 8.1.4 Identificación del pterocarpano neorautano

El perfil cromatográfico de las bandas (A, B, C, D, E y F) se muestra en la Figura 29 en el cual se observa que la banda B y C muestran una mancha café oscura. Se escogió el compuesto C ya que al agregar MeOH, formó agujas blancas alargadas y translúcidas las cuales se analizaron por RMN- $^1\text{H}$ , el espectro resultante (Figura 30) se comparó con espectros obtenidos para compuestos publicados de *B. intermedia*. El espectro coincidió con el neorautano, un pterocarpano del grupo de los isoflavonoides que se encuentra principalmente en la subfamilia Papilionoideae Familia Fabaceae a la que pertenece esta planta. Después de realizar una nueva columna para obtener más compuesto de la fracción 11, se obtuvieron 2 g; La RMN- $^1\text{H}$  confirmó que fuera neorautano, los desplazamientos químicos para cada hidrogeno se muestran en la Tabla 4.

El espectro de masas por la técnica DART (Figura 31) presentó  $[\text{M}^++1] = 353$ , es decir el ión molecular  $[\text{M}^+]$  de 352 que coincide con la fórmula mínima propuesta de  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$ . El neorautano presentó un punto de fusión de  $190\text{-}195^\circ\text{C}$ . Las características principales del compuesto se resumen en la Tabla 3.

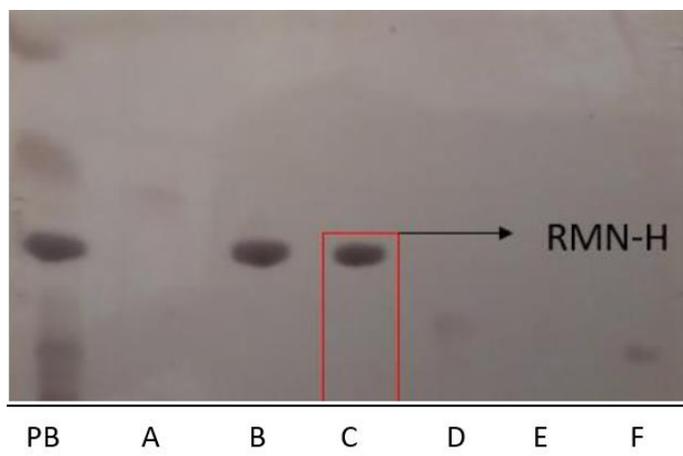


Figura 29. CCF de las fracciones aisladas por placa preparativa. (PB) Polvo Blanco y fracciones A, B, C, D, E y F, Reveladas con solución de sulfato Cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se enmarca en rojo la banda C enviada a análisis por RMN <sup>1</sup>H

Tabla. 3 Principales características del neorautano

PESO MOLECULAR	PUNTO DE FUSIÓN	PESO OBTENIDO	
352	190-195°C	2g	
FORMULA QUÍMICA	APARIENCIA DEL COMPUESTO		
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	Polvo blanco		

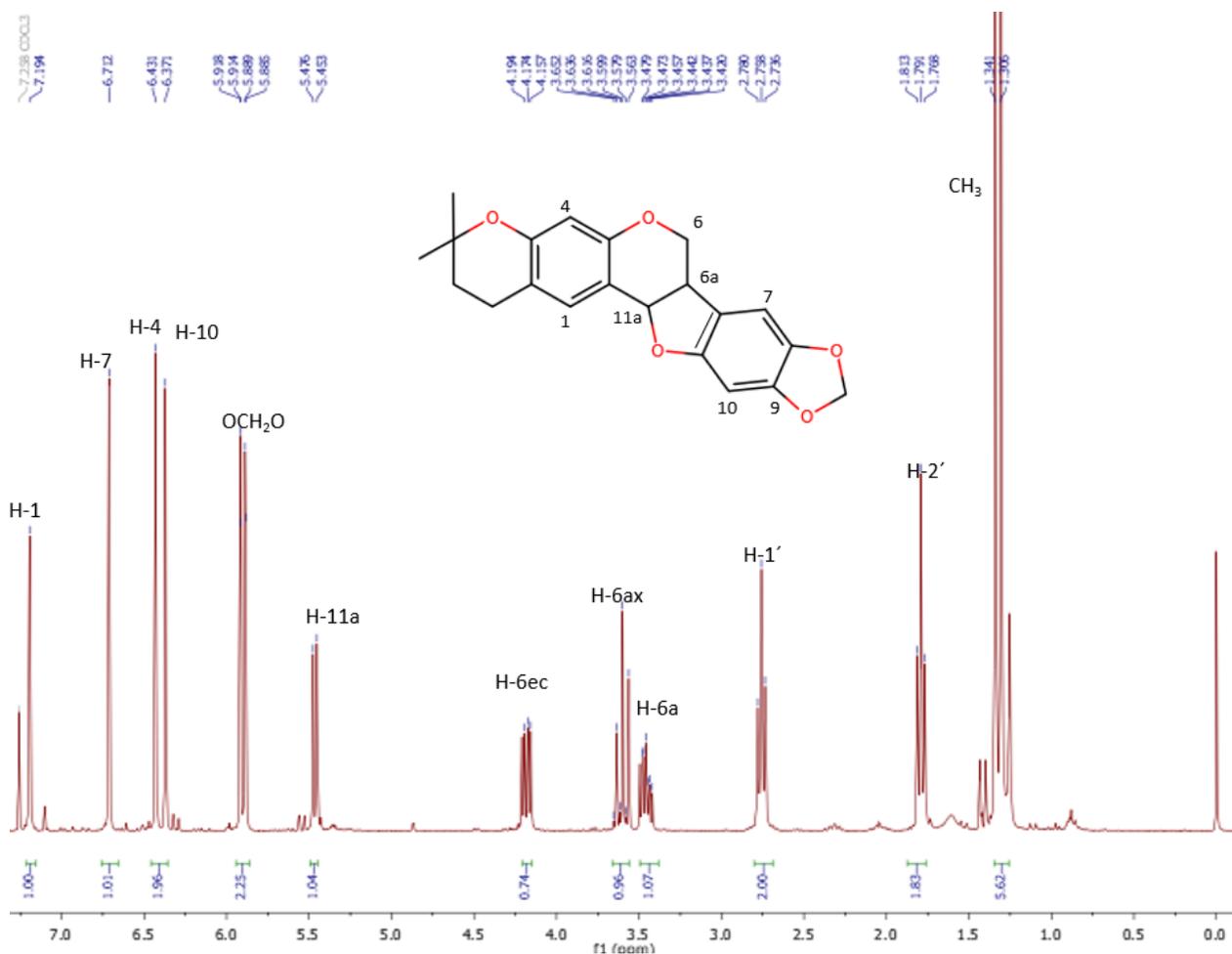


Figura 30. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del neorautano. 300MHz.  $\text{CDCl}_3$

Tabla 4. Desplazamientos químicos y asignación con base en el espectro de RMN-H del neorautano

Posición	$\delta$	$J(\text{Hz})$
H-1	7.19, s, 1H	
H-7	6.71, s, 1H	
H-4	6.43, s, 1H	
H-10	6.37, s, 1H	
$\text{OCH}_2\text{O}$	5.91, d, 1H, $J=1.2$	
	5.88, d, 1H, $J=0.9$	
H-11 <sup>a</sup>	5.46, d, 1H, $J=5.9$	
H-6 <sup>ec</sup>	4.18, ddd, 1H, $J= 0.6, 3.9, 8.1$	
H-6 <sup>ax</sup>	3.62, t, 1H, $J=5.1$	
H-6 <sup>a</sup>	3.45, ddd, 1H, $J=5.9, 3.9, 5.1$	
H-1'	2.75, t, 2H, $J=5.1$	
H-2'	1.79, t, 2H, $J=5.4$	
$\text{CH}_3$	1.34, s, 1H	
$\text{CH}_3$	1.30, s, 1-H	

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM  
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Acq. Data Name: 366 C-Neo  
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.5290..0.5430)  
Dr Reyes Ricardo/ Operador:Carmen Garcia-Javier Perez

Experiment Date/Time: 2/21/2018 2:24:43 PM  
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC  
Ionization Mode: DART+

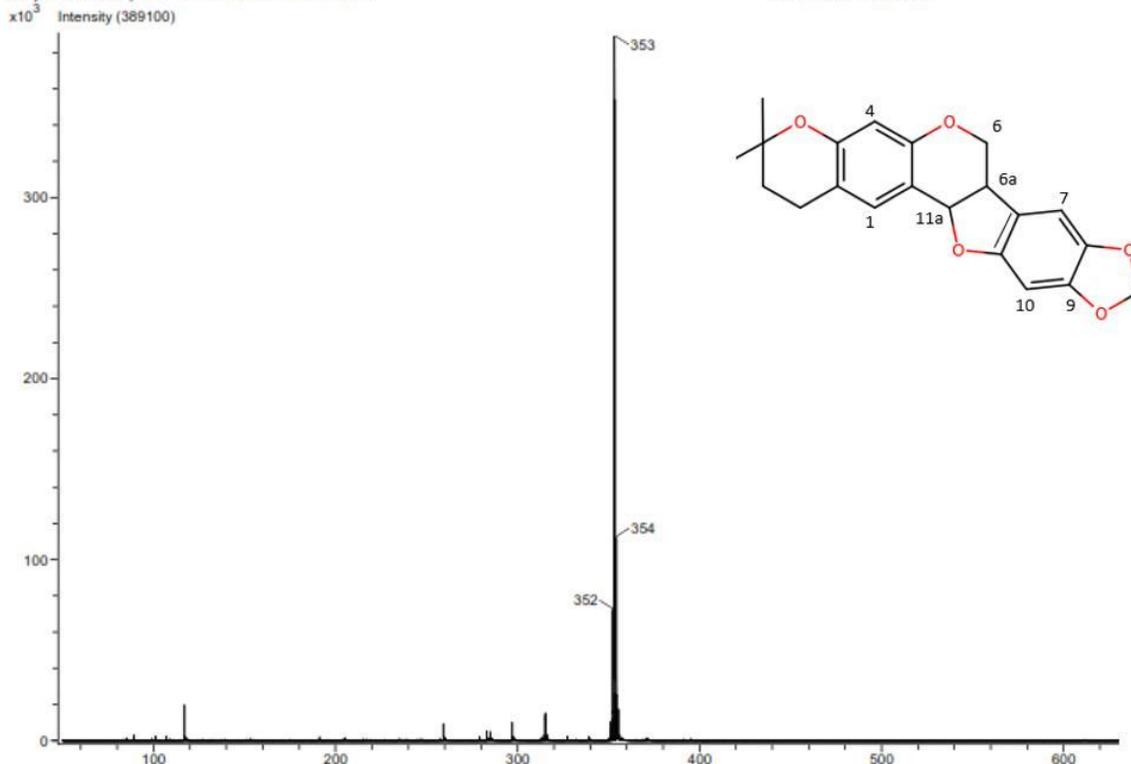


Figura 31. Espectro de Masas mediante DART (análisis directo en tiempo real) del neorautano.

### 8.1.5 Extracción alcaloidea de las hojas de *B. intermedia*

La CG/EM para el extracto alcaloideo de las hojas de *B. intermedia* (Figura 32) mostró dos alcaloides mayoritarios, la esparteína y un derivado denominado oxo-esparteína; también se aprecian otros compuestos no alcaloideos que corresponden a una lactona monoterpénica denominada loliólido y un hidrocarburo llamado tetrametil undeceno. Las estructuras de los compuestos se muestran en la Figura 33.

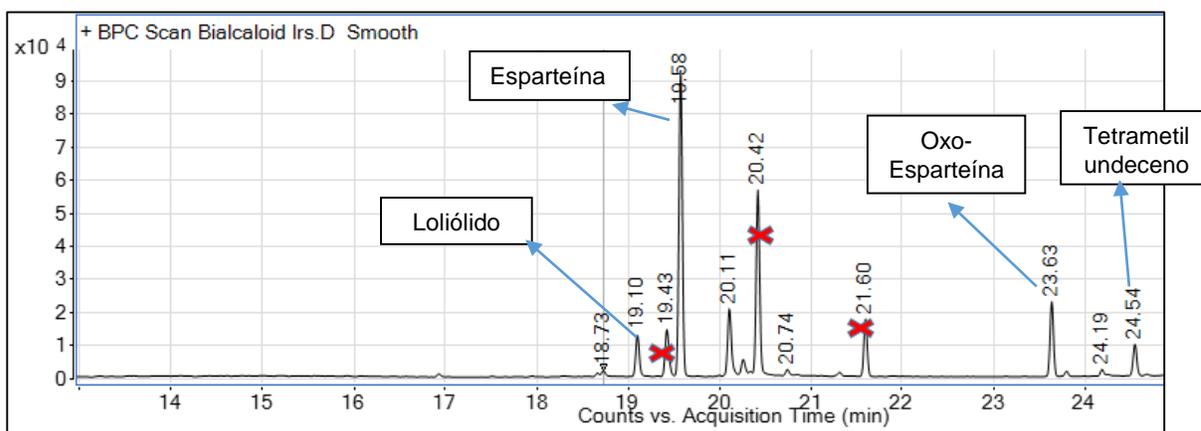


Figura 32. CG/EM FO2 de la extracción de alcaloides de hojas de *Brongniartia intermedia*

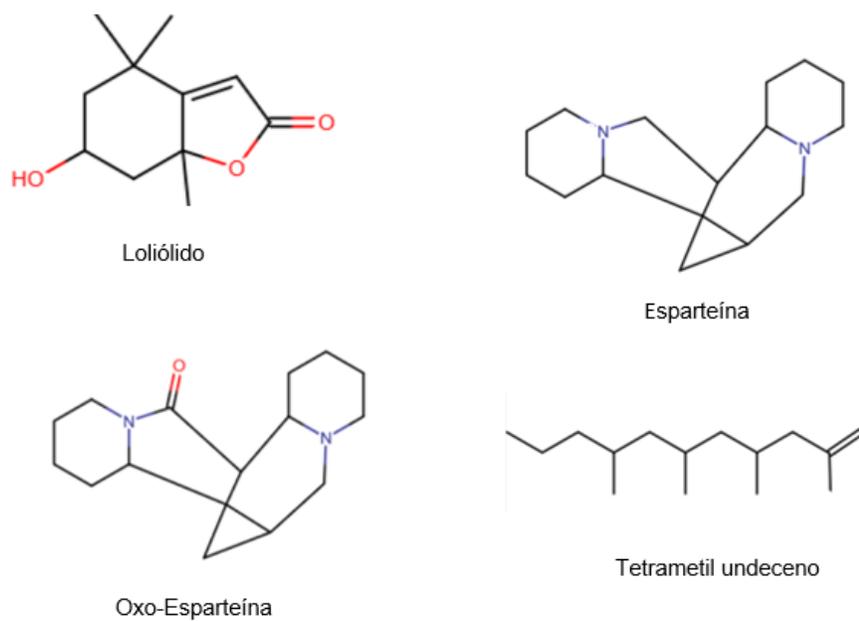


Figura 33. Estructura de los compuestos mayoritarios en la extracción de alcaloides de las hojas de *B. intermedia* identificados por CG/EM.

## 8.2 Efecto antiinflamatorio en el modelo de TPA

Los dos extractos de la raíz de *B. montalvoana* evaluados, mostraron un efecto antiinflamatorio significativo al compararse con el control negativo de inhibición (TPA sin tratamiento), el mayor porcentaje de inhibición lo mostró el extracto metanólico (MeOH) con un valor de 85%, mientras que para el extracto de diclorometano (DCM) fue de 70%.

Para *B. intermedia* también se obtuvieron resultados significativos en ambos extractos evaluados, el mayor porcentaje de inhibición del edema se obtuvo en el extracto de diclorometano (DCM) correspondiente al 65% de inhibición, mientras que el metanólico (MeOH) fue de 46%.(Figura 34)

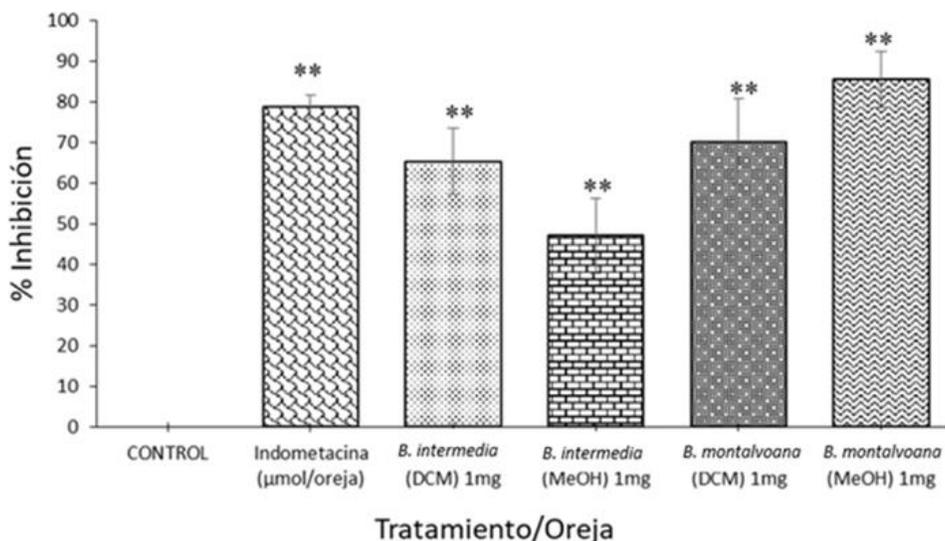


Figura 34. Actividad antiinflamatoria de los extractos en el modelo de TPA. Se utilizó como control positivo la Indometacina (1 μmol/oreja). Cada barra representa  $\bar{x} \pm \text{EEM}$ ,  $n=3$ . La diferencia entre grupos se analizó mediante una ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Dunnet,  $p < 0.01$  (\*\*).

El neorautano obtenido del extracto de diclorometano de *B. intermedia*, se evaluó por separado de los extractos y provocó un 34% de inhibición del edema sin embargo no fue estadísticamente significativo respecto al control negativo. (Figura 35).

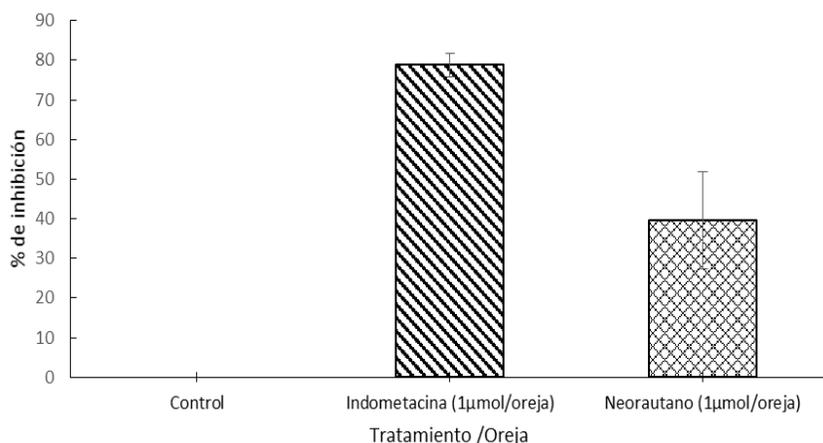


Figura 35. Actividad antiinflamatoria del neorautano en el modelo de TPA. Cada barra representa  $\bar{x} \pm \text{EEM}$ ,  $n=3$ . Se analizó mediante una ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Dunnet  $p < 0.05$ . Barras de error estándar.

El extracto metanólico de *B. montalvoana* tuvo un mayor porcentaje de efecto correspondiente al 85.40%, por lo cual se calculó la  $IC_{50}$ . La curva concentración respuesta tiene una relación directamente proporcional a las cuatro diferentes concentraciones evaluadas (0.032, 0.1, 0.32 y 1 mg/oreja) en la curva dosis-respuesta. La  $IC_{50}$  obtenida fue de 0.29 mg/oreja. (Figura 36)

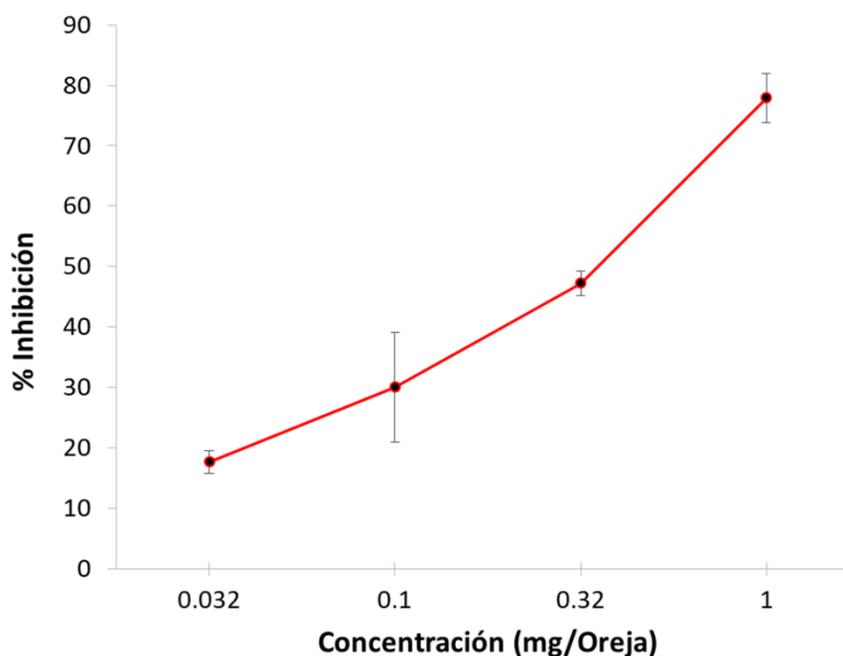


Figura 36. Curva concentración-respuesta del efecto antiinflamatorio del extracto MeOH de *Brogniartia montalvoana*. Cada punto representa el promedio  $\bar{x} \pm \text{EEM}$ ,  $n= 5$ .

### 8.3 Actividad de la enzima MPO

La infiltración de neutrófilos evaluada a través de la actividad de la enzima mieloperoxidasa mostró que el extracto MeOH de *B. montalvoana* tiene un rápido efecto al reducir la infiltración desde la primera dosis administrada (0.032 mg/oreja) correspondiente a un 70% de inhibición; mientras que para la dosis más alta administrada (1mg/oreja) muestra una inhibición casi total correspondiente al 97.57% (Figura 37).

La Figura 38 muestra los valores obtenidos en densidad óptica (D.O. 450 nm) comparado con un basal previo a la administración de TPA y un control de TPA sin tratamiento. El valor de IC<sub>50</sub> no se estimó ya que se encuentra debajo de la primera dosis de 0.032 mg/oreja que supero el 50%, por lo que se esperaría que la IC<sub>50</sub> estuviera debajo de este valor. Lo que sí se puede decir es que el comportamiento de los valores obtenidos claramente es dependiente de la dosis como lo muestra la Figura 36.

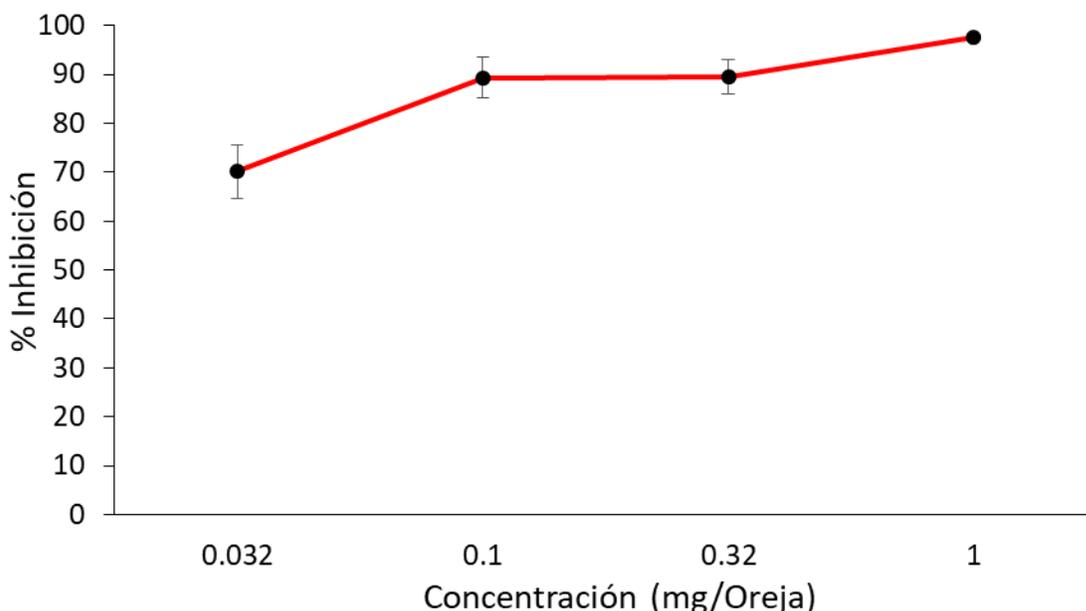


Figura 37. Curva concentración-respuesta del efecto antiinflamatorio del extracto MeOH de *Brogniartia montalvoana* en el ensayo de mieloperoxidasa. Cada punto representa el promedio  $\bar{x} \pm EEM$  n=5

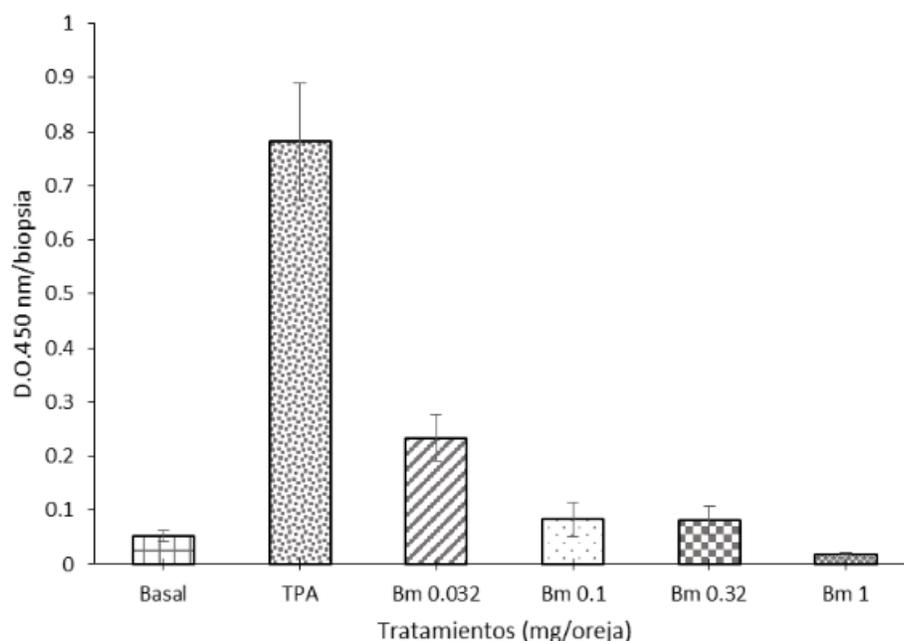


Figura 38. Actividad de la enzima mieloperoxidasa en muestras de oreja de ratón con inflamación inducida por TPA y tratadas con extracto de *B. montalvoana*. Cada barra representa el promedio de  $\bar{X} \pm \text{EEM}$  n=5. Valores en densidad óptica a 450nm.

#### 8.4 Pruebas antihemorrágicas

Se empleó como dosis reto 2 DHM (dosis hemorrágica mínima) reportada para *C. ruber lucasensis*, correspondiente a 1.68  $\mu\text{g}$  para la dosis de reto (2 DHM=3.36  $\mu\text{g}$ ) (Arnaud-Franco *et al*, 2018), pues como se muestra en la Tabla 5, con la dosis de 10 DHM se observaron otros efectos como convulsiones y mionecrosis por lo que se descartó para probar el efecto de los extractos. A 5 DHM no se observaron otros efectos locales, solo la hemorragia; sin embargo, los signos de nocicepción que provocó en los ratones fueron mucho mayores que con 2 DHM, por lo que se escogió ésta última para los ensayos de efecto antihemorrágico. Sin embargo, al analizar el lote de veneno extraído en esta tesis se encontró que la DHM era 1.2  $\mu\text{g}$  (Pozas-Ocampo, 2019). Es decir, la dosis de reto farmacológico fue efectivamente de 2.8 DHM.

Tabla 5. Comportamiento y efectos observados en la prueba preliminar de DHM (1.6 µg)

<b>DHM</b>	<b>Comportamiento (signos de nocicepción)</b>	<b>Otros efectos</b>
<b>2DHM (3.36 µg)</b>	podían permanecer en un sitio	-
<b>5DHM (8.4 µg)</b>	piloerección y contracción del cuerpo	-
<b>10DHM (16.8 µg)</b>	incapacidad de permanecer en un sitio	Mionecrosis y convulsiones leves

Usando como dosis reto 2 DHM (dosis hemorrágica mínima) reportada para *C. ruber*, correspondiente a 1.68 µg para la dosis de reto (2 DHM=3.36 µg) (Arnaud-Franco *et al*, 2018) y la relación veneno: extracto 1:50 peso:peso, observamos que el mayor efecto sobre la disminución del diámetro del halo hemorrágico lo mostró el extracto MeOH de la raíz de *B. intermedia* comparado con el control negativo de inhibición que solo contenía veneno y DMSO reduciendo el halo de 30.22±2.04 mm a 11.09±2.88 mm equivalente al 63.3% de inhibición.

El neorautano también redujo significativamente el diámetro del halo hemorrágico de 30.22±2.04 mm (control -) a 17±2.88 mm equivalente al 47.75%. Los demás extractos no tuvieron efecto significativo sobre el diámetro del halo hemorrágico. El extracto DCM de *B. intermedia* disminuyó a 23.75 mm, el extracto DCM de *B. montalvoana* a 22.6 mm y el extracto MeOH de *B. montalvoana* a 19.21mm (Figura 39).

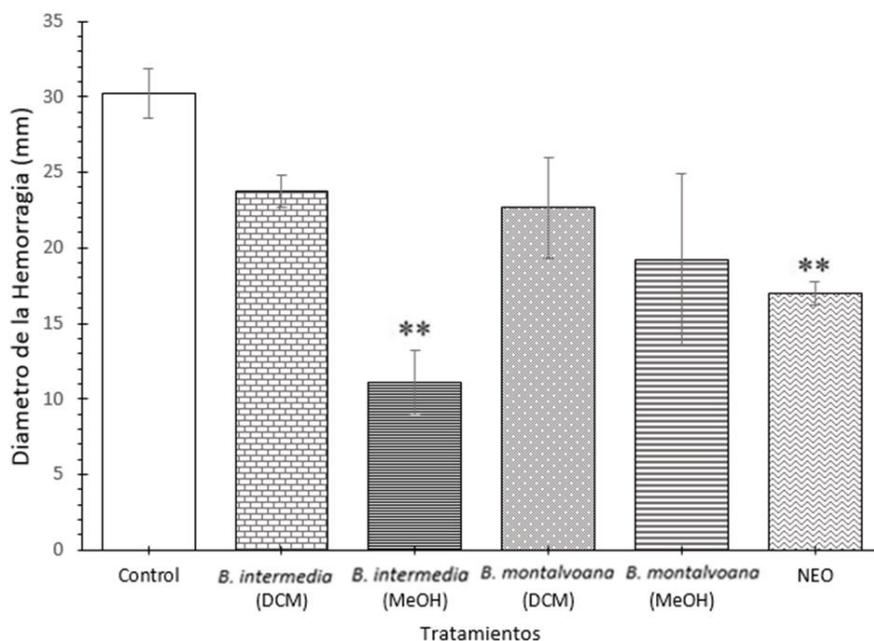


Figura 39. Actividad antihemorrágica expresada como diámetro del halo hemorrágico. Los datos representan el promedio de  $\bar{x} \pm EEM$   $n=3$  (excepto el control con  $n=6$ ) los valores de  $p=0.01$  (\*\*) se consideró como diferencia significativa con respecto al control. Prueba *post hoc* Tukey. Barras de error estándar.

Después de obtener las áreas hemorrágicas expresadas en pixeles, observamos que los resultados guardan la misma relación obtenida con el diámetro del halo, lo que confirma que tanto el extracto MeOH de *B. intermedia* y el compuesto neorautano poseen un efecto inhibitorio de la hemorragia en este modelo (Figura 40).

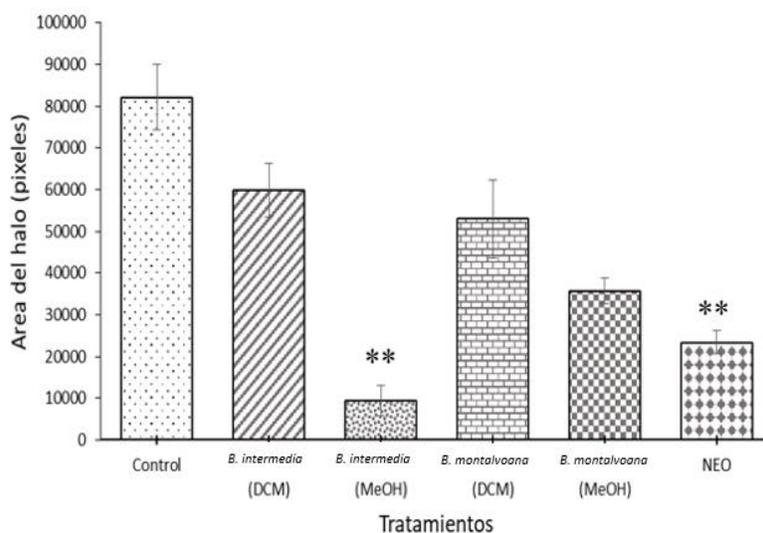


Figura 40. Actividad antihemorrágica, área expresada como pixeles. Los datos representan el promedio de  $\bar{x} \pm EEM$   $n=3$  (excepto el control  $n=6$ ) los valores de  $p=0.01$  (\*\*) se consideró como diferencia significativa con respecto al control. Prueba *post hoc* Tukey. Barras de error estándar.

## 9 DISCUSIÓN

### 9.1 FITOQUÍMICA

Se identificaron los principales compuestos presentes en *B. intermedia* y *B. montalvoana* tanto de la raíz como de las hojas. Se determinó que pertenecen principalmente a tres clases de metabolitos secundarios: isoflavonoides, triterpenos y alcaloides. Este tipo de compuestos han sido previamente reconocidos dentro del género (Reyes, 1994; Greinwald *et al.*, 1996; Salinas, 1998). En el caso específico de *B. montalvoana* no existe ningún registro acerca de su química, debido a que es una planta de reciente descripción y con una distribución muy restringida en torno a la cuenca del Río Balsas (Dorado y Arias, 1992). Los compuestos caracterizados son un aporte nuevo a la química del género. En el caso de *B. intermedia* se logró aislar el neorautano un compuesto isoflavonoide previamente reportado por Rall *et al.* (1972), extraído de las raíces de la planta *Neorautanenia edulis* y *N. amboensis* ambas de la familia Fabaceae. *Neorautanenia edulis* es usada según estos autores como veneno para peces. También Fabila (2001) logró aislar e identificar el neorautano de *B. intermedia*, la diferencia con el presente estudio es que lo obtuvo del extracto metanólico, mientras que nosotros del diclorometánico, lo que puede sugerir que este compuesto es especialmente abundante en la raíz de esta especie.

Por otro lado, de la extracción alcaloidea de las hojas de *B. intermedia* se obtuvo dos compuestos mayoritarios, la esparteína y un derivado la oxo-esparteína, lo que coincide con la extracción de alcaloides realizada con anterioridad por Greinwald *et al.* (1996) donde menciona que la esparteína está presente para al menos 4 de las 6 especies del género *Brongniartia* que estudió. Este alcaloide es utilizado en la medicina como antiarrítmico y sedante, además de ser bloqueador de canales de sodio (Eichelbaum *et al.*, 1979).

## 9.2 Actividad Biológica

### 9.2.1 Ensayo antihemorrágico

El presente estudio es uno de los primeros avances en el conocimiento científicamente validado de las propiedades antiviperinas de las plantas del género *Brongniartia*. El único estudio relacionado directamente con éste es el realizado por Reyes (1994) quien probó el efecto del edunol extraído de *B. podalyriodes* en un modelo de supervivencia en ratones pre tratados con veneno de *Bothrops atrox*. Cabe destacar que el edunol es un pterocarpano al igual que el neorautano del presente estudio y también las cabenegrinas A-1 y A-2 aisladas de *Harpalice brasiliensis* (Nakawa *et al.*, 1982) una planta taxonómicamente cercana con el género *Brongniartia*. Estos datos nos indican que la similitud estructural compartida por compuestos isoflavonoides está relacionada con las propiedades atribuidas a estas plantas como lo describió Dewick. (1988) y Mors. (1991); Sin embargo, específicamente hablando del efecto antihemorrágico, el extracto de diclorometano de *B. intermedia* presentó menor inhibición que el compuesto neorautano aislado, estos resultados sugieren que el neorautano puede ser uno de los compuestos principales causantes del efecto antihemorrágico y que en la mezcla del extracto por asociación con otros compuestos se esté viendo inhibida en su actividad

Contrario a lo hallado en nuestro estudio, la wedelolactona, un coumestano aislado de la planta *Eclipta próstata* (Asteraceae) y que conserva un parecido estructural con los pterocarpanos, fue probada contra el veneno de *Calloselasma rhodostoma* (Viperidae) en modelo hemorrágico en piel de ratón (Pithayanukul *et al.* 2007). En ese estudio probaron el extracto de acetato de etilo de la planta sobre 3 DHM obteniendo un 68% de inhibición y en la wedelolactona un 35% de inhibición contra la actividad hemorrágica, por lo que el efecto de la wedelolactona puede verse favorecido por sinergia con compuestos dentro de la mezcla del extracto, notando además que dicho extracto también es de baja polaridad.

Castro *et al.* (1999) estudiaron el potencial antihemorrágico de plantas costarricenses contra el veneno de *Bothrops asper* y mencionan que la presencia de compuestos de naturaleza flavonoide, tales como catequinas, flavonas,

antocianinas y taninos condensados en extractos, podrían tener una acción quelante del zinc requerido para la actividad enzimática de las metaloproteasas hemorrágicas (Bjarnason y Fox, 1994). Por otro lado, el mismo grupo de investigación menciona que los compuestos que mostraron mayor actividad antihemorrágica se encontraron en los extractos más polares como son los de acetato de etilo y los acuosos, lo que coincide con lo obtenido en nuestros resultados donde el extracto metanólico fue el que mostró mayor inhibición, muy probablemente porque los compuestos con esta actividad sean de naturaleza polar.

En relación al procedimiento utilizado para determinar la neutralización de la actividad hemorrágica, el veneno con el extracto se incubó antes de la inyección, con el fin de que los componentes del veneno interactuaran con potenciales moléculas inhibitoras, haciendo sensible el modelo, de esta manera es como suelen probar los sueros antiviperinos antes; en cuanto a las plantas existen variantes donde se inocula primero el veneno y posteriormente el extracto o compuesto (Gutierrez *et al.*, 1985) esto se puede hacer siempre y cuando ya se sepa que efectivamente el veneno tiene algún efecto sobre el veneno.

Se debe mencionar de manera importante la variación que presenta la DHM de *C. ruber* comparada con otras especies como: *B. asper* con 2 µg (Badilla-Baltodano *et al.*, 2006); *Calloselasma rhodostoma* (Viperidae) 12.94 µg (Pithayanukul *et al.*, 2007); *B. jararaca* 4.4 µg y *B. alternatus* 3.6 µg (Acosta *et al.*, 1998), esto es un hecho relevante ya que el efecto biológico más importante del veneno de *C. ruber* es precisamente la hemorragia, mientras que en las otras especies el principal efecto es coagulante, edematizante o miotóxico; De acuerdo con la clasificación de Mackessy (2008) el veneno de *C. ruber* es de Tipo 1 los cuales se caracterizan por tener una alta concentración de SVMP's responsables directos del efecto hemorrágico, además el veneno de *C. ruber* presenta un mayor peso seco y una mayor concentración de proteínas (Glenn y Streainght, 1985), lo que puede sugerirnos que probablemente nuestros extractos y compuesto pueden estar actuando sobre las proteínas SVMP, causando mediante un mecanismo complejo su inhibición.

En cuanto al análisis de los datos obtenidos, tradicionalmente el método de medición por cuatro puntos es el generalmente usado; sin embargo, se decidió procesar también por el programa Image J para robustecer el análisis. Esta herramienta ha sido previamente usada para el análisis de halos hemorrágicos por Reis *et al.*, (2014), obteniendo buenos resultados. En nuestro caso se pudo observar que la comparación entre diámetros y áreas para los halos hemorrágicos mostró la misma relación entre los grupos por lo que se confirman los grupos con mayor actividad.

### 9.2.2 Ensayo antiinflamatorio

En México gran cantidad de información etnobotánica indica el uso que se le da a diversas plantas sobre la inflamación general o síntomas relacionados al proceso inflamatorio (Susunaga-Notario *et al.*, 2014). Varios registros indican el uso de plantas del género *Brongniartia* para el tratamiento de mordedura de serpiente, aplicando cataplasma de sus raíces, hojas o corteza a la herida (Reyes, 1994) es importante mencionar que la mordedura de serpiente independientemente del veneno, desencadena el proceso inflamatorio por diferentes vías (véase antecedentes). De esto surgió el interés de evaluar las plantas utilizadas en este estudio sobre el proceso inflamatorio *per se*, nuestros resultados permitieron corroborar la información etnobotánica de su uso sobre heridas no solo de serpiente venenosa, si no de serpientes sin veneno que al morder desencadenan la inflamación.

De acuerdo con lo descrito por Gutierrez *et al.* (2009), la inflamación producida por la mordedura de serpiente se agrava cuando va acompañada de inoculación de veneno, ya que la inflamación provoca que la estabilidad de la matriz extracelular sea aún más frágil y ceda con mayor facilidad a la extravasación lo cual produce un efecto sinérgico con las metaloproteasas del veneno hemotóxico.

Con respecto a especies vegetales ya reportadas con actividad anti-inflamatoria sobre serpientes venenosas, Reis *et al.* (2014) comprobó el efecto antiinflamatorio del extracto hidroetanólico de *Tabebuia aurea*, una planta reportada para aliviar la inflamación y contra la mordedura de serpiente. El extracto fue evaluado sobre la

inflamación inducida por veneno de *Bothrops neuwiedi* en pata de ratón, midiendo además el reclutamiento de polimorfonucleares, sus resultados mostraron que esta planta posee un efecto anti-inflamatorio y disminuye en un 32.2% el reclutamiento de polimorfonucleares.

Según los resultados obtenidos en este estudio podemos decir que los extractos de las plantas *B. intermedia* y *B. montalvoana* poseen actividad sobre los efectos hemorrágico e inflamatorio de la mordedura de serpiente venenosa, estos efectos se encuentran estrechamente ligados y responden a complejas vías de acción.

## 10 CONCLUSIONES

- 1.- Del extracto de diclorometano de la raíz de *Brongniartia intermedia* se aisló el pterocarpano neorautano, previamente obtenido por Fabila (2001) del extracto metanólico.
- 2.- Los extractos de diclorometano y metanol de *B. intermedia* mostraron un efecto antiinflamatorio tópico con 65 y 46% de inhibición. El neorautano no mostró inhibición significativa (34%) estadísticamente.
- 3.- El extracto metanólico de la raíz de *B. intermedia* presentó efecto antihemorrágico (diámetro del halo) contra el veneno de *Crotalus ruber lucasensis* con 63% de inhibición. El neorautano también lo neutralizó en un 47%. Ambos valores son significativos estadísticamente. El extracto de diclorometano no fue significativo.
- 4.- Los extractos de metanol y de diclorometano de *B. montalvoana* mostraron actividad antiinflamatoria tópica, el primero presentó el mayor efecto con 85% de inhibición, e IC<sub>50</sub> de 0.29mg/oreja.
- 5.- Los extractos de diclorometano y metanol de la raíz de *B. montalvana* no presentaron efecto antihemorrágico.
- 6.- En los extractos de raíz de diclorometano *B. intermedia* analizado por CG-EM se pudo determinar la presencia de ésteres de ácidos grasos como ácido-9-metil éster dodecanoico, 1-bromo-3,7-dimetil-2,6-octadieno y 6-metil-2-metil decano.
- 7.- La extracción alcaloidea de hojas de *B. intermedia* mostró la abundante presencia de esparteína, un alcaloide frecuente en plantas de la familia Fabaceae; así como un derivado denominado oxo-esparteína.
- 8.- El análisis realizado CG-EM para el extracto de hexano de la raíz de *B. montalvoana* permitió identificar triterpenos como el estigmastan-6-22-dien.3,5-dehidro,estigmastan-3,5-dieno, lupeol, lup-20 (29)-an-3-ona y también fitoesteroles como el  $\beta$ -sitosterol.

- De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que los extractos de las plantas *B. intermedia* y *B. montalvoana* tienen efecto antiinflamatorio y la primera además efecto antihemorrágico contra el veneno de *C. ruber*, lo que nos permite proponerlas para el estudio de alternativas terapéuticas contra los efectos locales del veneno de serpientes con actividad hemotóxica, así como profundizar en sus propiedades.

## 11 PERSPECTIVAS

- Se propone comparar los resultados del extracto metanólico de *B. intermedia* y el neorautano, que fueron los que presentaron mayor efecto antihemorrágico, con un nuevo ensayo donde se administren oralmente el extracto o compuesto y previo a la inyección del veneno.
- Se observó que las manchas hemorrágicas tenían más o menos intensidad, esta variación podría sugerir, que los extractos disminuyen además del diámetro, el efecto hemolítico del veneno; por lo cual se propone verificar cuantitativa o cualitativamente la población de eritrocitos lisados y su potencial protección por los extractos.
- Completar los análisis espectroscópicos (HSQC, HMBC, DEPT 135 y DEPT 90) del Neorautano para contribuir al conocimiento del mismo, pues estos estudios no se han realizado anteriormente.
- Completar los estudios químicos de ambas especies, en especial se propone enfocar la búsqueda de isoflavonoides en los extractos metanólicos.
- Ya que se observó un claro efecto antiinflamatorio de los extractos, se propone evaluar estos efectos en otros modelos de inflamación.
- La mordedura de serpiente aún sin la presencia del veneno es un vector de bacterias que provocan complicaciones clínicas importantes, se propone probar los extractos contra la actividad antibacteriana.
- Se propone comprobar si *B. podalyriodes*, una especie del género estudiada por Reyes (1994), posee efecto antihemorrágico, ya que de ésta planta viene el pterocarpano edunol que presentó disminución de la letalidad en veneno de *B. asper*

## 12 LITERATURA CITADA

1. Acosta, O.C., Koscinczuk, P., Teible, P., Sánchez-Negrete, M., Ruiz, R., Maruñak, S. & Bogarin Guisella. (1998). Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en la almohadilla plantar del ratón inducidos por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon*. 36 (8). 1165-1172.
2. Alape-Giron, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Mahmood, S. & Calvete J.J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*. Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*. 7: 3556-3571.
3. Alzate-Echeverri, A. M. (2003). “Las experiencias de José Celestino Mutis sobre el uso del guaco como antiofídico”, *Asclepio. Revista de Historia de la Medicina y de la Ciencia*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Centro de Estudios Históricos, Madrid, vol. LV-2, 257-280.
4. Bazaá, A., Marrakchi, N., Ayeb, M., Sanz, L. & Calvete, J.J. (2005). Snake venomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics* 5:4223-4235.
5. Bjarnason, J. B. & Fox, J. W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.*62, 325-372.
6. Breytembach, J.C., Leipoldt, J.G., Gerhardus, J.H., Rall, J.H. & Roux, D. (1982). Absolute configuration and conformation of a (-) pterocarpan, (-)-edunol. *South African Journal of Chemistry* 36 (1):4-6.
7. Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B. & Gutierrez, J.M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 5 (83), 1736-1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>

- 
8. Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, Cornell University Press, 2 vols. Ithaca, New York. xvii. 870 pp.
  9. Campbell, J. & Lamar, W. W. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Cornell University Press. Ithaca and London.
  10. Chacko N, Ibrahim M, Shetty P and Shastri C.S.: Evaluation of Antivenom Activity of Calotropis Gigantea Plant Extract against Vipera Russelli Snake Venom. *Int J Pharm Sci Res*, 2012; Vol. 3(7): 2272-2279.
  11. Chacur, M., Pícolo, G., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P. & Cury, Y. (2001). Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 39, 1173–1181.
  12. Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J.M., 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33, 31–39
  13. Corona, R.M.I. (1993). Aislamiento y determinación estructural de metabolitos secundarios presentes en *Brongniartia intermedia* (leguminosae). Universidad veracruzana (Orizaba). Tesis. Instituto de Química. UNAM.
  14. Cuesta, T. JD, Restrepo, H. AM. (2010). Accidente ofídico bothrónico. en: Peña LM, Arroyave CL, editores. *Fundamentos de medicina: Toxicología clínica*. Medellín, Colombia: CIB.
  15. Daltry, J, Wuster, W. Thorpe, RS. Diet and snake venom evolution. *Nature* 1996; 379(6565): 537-540.
  16. Dorado, O. (1987). *Brongniartia sousae* (Fabaceae: Faboideae), a new species from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. *Aliso* 11(4): 631–634.
-

- 
17. Dorado, O. (1992). A systematic and evolutionary study of the genus *Brongniartia* (Fabaceae). Ph.D. dissertation. Claremont Graduate School. Claremont, USA. 160 pp.
  18. Dorado, O. & Arias, D. (1992). *Brongniartia montalvoana* (Fabaceae: Faboideae), una especie nueva de la Cuenca del Río Balsas. *Acta Botanica Mexicana*, (17), 13-17.
  19. Dugan, E., Figueroa, A. & Hayes, W. (2008). Home range size, movements, and mating phenology of sympatric red diamond (*Crotalus ruber*) and southern Pacific (*C. oreganus helleri*) rattlesnakes in southern California. Pp. 353-364.
  20. Eichelbaum, M., Spannbrucker, N. & Steincke, B. (1979). *Eur J Clin Pharmacol* 16: 183. <https://doi.org/10.1007/BF00562059>
  21. Ernst, C., Ernst, E. (2012). *Venomous Reptiles of the United States, Canada, and Northern Mexico*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
  22. Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sánchez, E.F., Richardson, M., Fox, J.W. & Gutierrez, J.M. (2011). Role of collagen and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS ONE* .6.
  23. Espino-Solís, L. Riaño-Umbarila, B. Becerril, L. Possani. 2009. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospective (Revisión). *Journal of proteomics* 72: 183 – 199
  24. Fan, H.W. & Cardoso, J.L. (1995). Clinical toxicology of snake bites in South America. In: J.Meier, J.White, editors. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton (Florida): CRC Press, p.667-688.
  25. Flores-Villela, O. A. & García-Vázquez, U. O. (2014). “Biodiversidad de reptiles en México”. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 467–475.
  26. Gallegos-Flores, M.G. (2013). Caracterización de la reactividad cruzada del faboterápico polivalente antiviperino contra el veneno de serpientes

mexicanas del género *Crotalus*, especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*. (Tesis de Maestría). Instituto Nacional de Salud Pública, Escuela de Salud Pública. México.

27. Glenn, J.L., R.C. Straight. 1985. Venom properties of the Rattlesnake (*Crotalus*) inhabiting the Baja California region of Mexico. *Toxicon*. 23 (5): 769–75.
  28. Gold, B.S., Dart, R.C. & Barish, R.A. (2002). Bites of Venomous Snakes. *N. Engl. J. Med.* 347: 347-356.
  29. Greinwald, R., Reyes-Chilpa, R., Ross, J.H., Witte, L. & Czygan, F.C. (1996). A survey of alkaloids in the genera *Harpalyce* and *Brongniartia* (Fabaceae-Brongniartieae). *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 749–755
  30. Gutiérrez, J.M. & León, G. (2009). Snake antivenoms. Technological, clinical and public health issues. In: *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, M.E. de Lima; A.M.C. Pimienta; M.F. Martin-Euclaire; R.B. Zinggali & H. Rochat, (Eds).393-421. Editora UFMG, ISBN 978-85-7041-735-0, Belo Horizonte, Brasil.
  31. Gutiérrez, J.M., León G. & Lomonte, B. (2003). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clinical Pharmacokinetics.*, 42, (8), 721-741
  32. Gutiérrez, J.M. Rucavado, A. Chaves, F., Díaz, C. & Escalante, T. (2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 54(7):958–75.
  33. Gutiérrez, J.M. & A. Rucavado. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850
  34. Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Bolaños, R., (1980a). Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603–610.
-

- 
35. Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E., 1981a. Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19, 493–500.
36. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A. & Cerdas, L. (1986b). Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol. C* 85, 171–175.
37. Gutiérrez, J.M. & Lomonte, B. (2003). Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. en: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S. & Haddad, V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, SaoPaulo, pp. 310–323.
38. Gutierrez, J.M., Romero, M., Diaz, C., Borkow, G. & Ovadia, M. (1995). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic Activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (tercipelo). *Toxicon*, v. 33, 19-29.
39. Hargreaves A.D., Swain, M.T., Hegarty, M.J., Logan, D.W. & Mulley, J.F. (2014). Restriction and recruitment-gene duplication and the origin and evolution of snake venom toxins. *Genome Biological Evolution*; 6(8): 2088-2095
40. Harrison, R.A. Hargreaves, A., Wagstaff, S.C., Faragher, B. & Lalloo, D.G. (2009). Snake Envenoming: A Disease of Poverty. *PLoS Negl Trop Dis*. Dec.3(12): 569.
41. Heinrich, M., Velazco, O. & Ramos, F., (1990): Ethnobotanical report on the treatment of snake-bites in Oaxaca, Mexico. *Curare* 13: 11- 16.
42. Ingham, J.L. (1981): Phytoalexin induction y its taxonomic significance in the Leguminosae (Subfamily Papilionoideae). En: *Polhill, R.M. & Raven*

- P.H.* (eds.). *Advances in Legume Systematics. Pt. 2.* Royal Botanical Gardens. Kew, Great Britain. p. 599-626.
43. Jorge, M.T., Ribeiro, L.A. & O'Connell, J.L., (1999). Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93, 401–408
44. Juárez, P. Sanz, L. & Calvete, J.J. 2004. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics* 4:327 -338
45. Kamiguti, A.S., Hay, C.R.M., Theakston, R.D.G. & Zuzel, M. (1996). Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 34: 627-642
46. Kasturiratne, A. Wickremasinghe, R. De Silva, N. N., Gunawardena, K., Pathmeswaran, A. & Premaratna, R. (2008). The Global Burden of Snakebite: A Literatura Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med.* 5(11)
47. Klauber, L. (1982). *Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind.* Berkeley: University of California Press.
48. Klauber, L. M. (1972). *Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind.* 2nd ed. 2 Vols. Univ. California Press, Berkeley.
49. Kondo, H., S. Kondo, H. Ikezawa, R. Morita & Ohsaka, A. (1960). Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 13: 43-51.
50. Kunth, en von Humboldt, F.W.H.A., Bonpland, A.J.A. & Kunth, C.S. (1824). *Nov. Gen. Sp.* 6. [folio](#) p. 364, [quarto](#) p. 465.
51. Laustsen, A.H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernández, J. & Gutiérrez, J.M. (2015). 'Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepsis*) venom

- through venomomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development', *Journal of Proteomics*, vol. 119. 126–142
52. Li, Z.Y., Yu, T.F. & Lian, E. (1994). Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32(11): 1349-1358.
53. Lomonte, B., Tarkowski, A. & Hanson, L.Å. (1993). Host response to Bothrops asper snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93–105.
54. Mackessy, S.P. 2008. Venom composition in rattlesnakes: Trends and Biological significance. En: William K. Hayes, Michael D. Cardwell, Kent R. Beaman, y Sean
55. P. Bush (eds.). *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda, California.
56. Martins, M.R., Marques, O.A. & Sáizima, I. (2002). Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus Bothrops. In: Schuett GW, Höggren M, Greene H, eds. *Biology of the Vipers*. Indiana: Biological Sciences Press: 307-328.
57. Morais, V.M. & Massaldi, H. (2009). Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *J. Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 15, (1), 218.
58. Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M. & Gutiérrez, J.M. (1994). Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* 32: 977-987.
59. Mors, W.B. (1991). Plants active against snakebite. *Economic y Medicinal Plant Research*. Vol. 5. Academic Press. U.S.A., pp. 353-373
60. Moura da Silva, A.M., Marcinkiewicz, C., Marcinkie-Wicz, M. & Niewarowski, S. (2001). Selective recognition of  $\alpha 2\beta 1$  integrin by jararhagin, a metalloproteinase- /disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Thromb. Res*. 102: 153-159

- 
61. Nakawa, M., Nakanishi, K., Darko, L., & Vick L.A. (1982). Structures of cabenegrins A-I y A-II, potent antisnake venoms. *Tetrahedron Letters* 23(38):3855-3858.
62. Navarrete-Zamora, M. B., Silva-Suárez, W. H., Vargas-Mas, E.A. (2010). Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 11, núm. 7, julio, pp. 1-17. Veterinaria Organización Málaga, España.
63. Noriega-Trejo, R. (1993). Mordeduras de serpientes venenosas y plantas medicinales: Una visión general. *Simposio sobre Herbolaria Aplicada en Veterinaria*. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Noviembre 10-12, 1993. 13 pp.
64. Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T. & Hattori, S. (2003). Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon* 42:841-854
65. Olivo, R.A., Teixeira, C.F.P., Wallace, J.L., Gutiérrez, J.M. & Zamunér, S.R., (2007). Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon* 49, 670–677.
66. Ortega, C. (2008). "Evaluación de la actividad adyuvante de triterpenos y saponinas en la producción de suero antiviperino". (Tesis de Maestría en Ciencias en Inmunología). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
67. Otero, R. Núñez, V. Barona, J., Díaz, A. & Saldarriaga, M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *IATREIA*. Marzo; 15(1)
68. Panfoli, I., Calzia, D., Ravera, S. & Morelli, A. (2010). Inhibition of Hemorrhagic Snake Venom Components: Old and New Approaches. *Toxins*, 2, 417-427
-

- 
69. Patel M. 2012 In Vivo Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti-Inflammatory Activity. A Review. International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences. 1(2):01-05
70. Pennington, C. W. (1967). Tepehuan of Chihuahua. Their Material Culture, University of Utah Press. Salt Lake City. U.S.A.
71. Perales, J. & Domont, G.B. (2002). Are Inhibitors of Metalloproteases, Phospholipases A 2 and Myotoxins Members of the Innate Immune System. Pp: 435-455 En: Menéz A. (ed.). Perspectives in Molecular Toxinology. John Wiley & Sons. 485 pp.
72. Pough, H.F., Cadle, J., Crump, M., Savitzky, A. & Wells K. (1998). Herpetology. Prentice Hall. Londres. 578 p.
73. Pozas-Ocampo F.I. (2019). Caracterización Toxicológica del veneno de *Crotalus ruber lucasensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) de la Península de Baja California, México. Tesis de Maestría. CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste).
74. Rall, G.J.H., Brink, A.J. & Engelbrecht, J.P. (1972). J.S. Afr. Chem. Inst. 2, 77, 139846
75. Reis, F.P., Senna-Bonfa, I.M., Bezerra-Cavalcante, R., Okoba, D., De Souza-Vasconcelos, S.B., Candeloro, L., De Oliveira-Filiu, W.F., Duenhas-Monreal, A.C., Da Silva, V.J. Santa Rita, P.H., Carollo, C.A. & Toffoli-Kadri, M.C. (2014). *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. Journal of Ethnopharmacology (158) 352-357
76. Reyes-Chilpa, R., Gómez-Garibay F., Quijano, L., Magos-Guerrero G.A., & Ríos-Castillo T., (1994). Preliminary results on the protective effect of (-)-edunol a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae) against *Bothrops atrox* venom in mice. Journal of Ethnopharmacology 42:199-203.
-

- 
77. Reyes-Chilpa, R. & Jiménez-Estrada, M. (1995). Química de las plantas alexiteras. *interciencia* 20(5): 257-263. URL: <http://www.interciencia.org.ve>
78. Ribeiro, L.A. & Jorge, M.T. (1997). Accidentes por serpentes do género Bothrops: serie de 3139 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 475–480.
79. Ricciardi, A. I. (2007). Plantas con actividad alexitera en el norte del país. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 6, (5).
80. Ríos-Dalenz, J. (1996). Curso de Patología, Tomo I Patología Especial. Capítulo III: Inflamación y Reparación. La Paz: Bolivia; 29-46.
81. Rydberg, P. A. (1923). Subtribe Brongniartianae. 186–197. *en*. North American Flora, Vol. 24, Part 3. The New York Botanical Garden. Bronx.
82. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. (Edición digital: INECOL 2010).
83. Rzedowsky, J. 1979. Problemática y metodologías de los estudios florísticos de México. Coloquio sobre estudios florísticos y su proyección en México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. (Ponencia inédita)
84. Salinas-Sánchez J. (1998). Química de *Brongniartia podalyriodes* Y *Brongniartia intermedia* (Leguminosae). (Tesis de Licenciatura). UAM. Xochimilco.
85. Secoy, D.M. & Smith, A.E. (1983). "Use of plants in control of agricultural and domestic pests". *Econ. Bot.*, 37(1): 28-57.
86. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. 2011 Información preliminar. [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd\\_informacion.html](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_informacion.html)
-

- 
87. Soares, A.M., Ticli, K. F., Marcussi, S., Lourenço, V.M., Januario, A. H., Sampaio, S. V., Giglio, J. R., Lomonte, B. & Pereira, P. S. (2005). Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. *Current Medicinal Chemistry*. 12, (22), 2625-2641
88. Soto, N. J.C. (1987). Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas, Estados de Michoacán y Guerrero. México. Tesis. UNAM. 231 pp.
89. Sousa, S. M. & Delgado, A. S. (1993). Mexican Leguminosae: phytogeography, endemism, and origins. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.). *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Oxford University Press, New York, pp. 459-511.
90. Souza, D.H.F., M.R.C. Lemma, L.L., Ferreira, J.P., Faria, M.L.V., Oliva, R.B., Zingali, S., Niewarowski, & Selistre-de-Araujo, H.S. (2000). The disintegrin-like domain of the snake venom metalloproteinase alternatin inhibits  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 384: 341-350.
91. Standley, P.C., (1922): *Brongniartia*. En: *Trees and Shrubs of Mexico*. Contributions from the United States National Herbarium. 23: 466-470. Reprint (1982) por Strauss & Cramer GmbH, Germany.
92. Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G. & Chaves, F. (2009). Inflammation induced by Bothrops asper venom. *Toxicon*, 54,(1), 67-76.
93. Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacur, M. & Cury, Y. (2003a). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon* 42, 947–962
94. The Reptile Data Base (11 de Febrero de 2019). Taxonomy of Viperidae. Recuperado de <http://reptiledatabase.reptarium.cz/search?search=viperidae&submit=Searh>
95. Thomson, R., Wright, A. & Shaffer, H. (2016). *California Amphibian and Reptile Species of Special Concern*. Oakland: University of California Press.
-

- 
96. Villanueva, M. Maguina, C. Cabada, M. (2004). Ofidismo en la provincia de Chanchamayo, Junín: revisión de 170 casos consecutivos en el Hospital de Apoyo de La Merced. *Rev Med Hered*; 15(2): 82-7. ISSN 1018-130X
97. Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2009). *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Third Edition. Burlington, Massachusetts, U.S.A.: Academic Press.
98. Zabala, J. Diaz-Sánchez, J.G., Sánchez-Vega, J.T. & Ruiz-Sánchez, D., Castillo, L. (2002). Serpientes y reptiles de importancia médica en México: *Revista de la Facultad de Medicina*; 45:212–219.
99. Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Muscará, M.N., Teixeira, S.A. & Teixeira, C.F.P. (2001). Bothrops asper and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon* 39,1505–1513.
100. Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Gutiérrez, J.M. & Teixeira, C.F.P. (2005). Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesión molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon* 46, 806–813.
101. Zertuche, J. (1981). Mexican reptiles of significance for public health and their geographic distribution. *Salud Pública Mex*; 23:329–343.
-

## 13 ANEXO 1

### A) REACTIVOS QUIMICOS

#### Preparación de la solución de sulfato cérico al 1%

Se añaden 12 g de  $CeSO_4$  a 350 g de hielo posteriormente se agregan 22.2 mL de  $H_2SO_4$  concentrado (40 g) y se agita con una varilla de vidrio

### B) REACTIVOS USADOS PARA LA PRUEBA DE MIELOPEROXIDASA

Preparación de los reactivos y soluciones requeridas en el ensayo

**Buffer de fosfatos (PBS) 80 mM, pH= 5.4**. Pesar las siguientes sales y aforar a 500 mL.

<i>KCl</i>	<i>100mg</i>
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	5,244mg
<i>NaCl</i>	4.000mg
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O</i>	524.5mg

**HTAB (Bromuro de hexadecitrimetil amonio) 0.5 %**. Pesar 0.5 g de HTAB y aforar a 100 ml con PBS 80 mM, pH= 5.4

- *3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) 18.4 mM*

El reactivo se prepara en una solución de dimetilformamida (DMF) al 50 % en agua. El TMB se disuelve primero en DMF y después se agrega la misma cantidad de  $H_2O$  desionizada para completar el volumen final usando la siguiente relación:  $18.4mM=4.42\text{ mg/ml}$

- **Peróxido de Hidrogeno ( $H_2O_2$ ) 0.017%**

Solución A (concentrado): peróxido de hidrogeno 1.7%. Tomar 170 $\mu$ L de peróxido de hidrogeno al 30% y aforar a 10ml con agua desionizada

Solución B (de trabajo): peróxido a 0.017%, tomar los volúmenes mostrados en la siguiente tabla.

<i>Volumen de solución de trabajo a preparar (ml)</i>	<i>Alícuota solución A (<math>\mu</math>L)</i>	<i>Agua desionizada</i>
10	100	9.9
20	200	19.8
30	300	29.7

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M)** Tomar 10.66 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y aforar a 100 mL con agua des ionizada. Precaución: colocar en el matraz aproximadamente 50 ml de agua fría y agregar lentamente el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para evitar proyecciones de la solución

## **Anexo 2 ELABORACIÓN DE POOL DE VENENO**

Pesar de 3 a 5 mg de cada tubo de veneno extraído de las serpientes y colocarlos en un tubo eppendorf previamente etiquetado y pesado.

Preparación de la solución Madre (stock): Diluir la mezcla de veneno liofilizado en un tubo eppendorf, a una concentración aproximada de 10 mg/ml.

Preparación de la Dilución de Trabajo obtenida del pool: La solución de trabajo estará preferentemente a una concentración de 0.5 mg/ml. Para ello, se toman \_\_\_\_ (cantidad a calcular) de la solución madre (Stock) y se diluirá con \_\_\_\_ (cantidad a calcular) de Solución salina isotónica, en un tubo eppendorf. (Las cantidades se ajustan de acuerdo a la DHM que se use y la cantidad de extracto usada como reto)

**Anexo 3 MEDICIONES DEL DIÁMETRO DEL HALO HEMORRÁGICO EN PIEL DE RATÓN**

<b>PRUEBA EXTRACTO METANOL <i>Brongniartia intermedia</i></b>			
# DE RATON	VERTICAL (cm)	HORIZONTAL (mm)	PROMEDIO
RATON 1	10.54	20.38	15.26
RATON 2	9.66	7.07	8.36
RATON 3	13.07	6.23	9.65

<b>PRUEBA EXTRACTO DICLOROMETANO <i>Brongniartia montalvoana</i></b>			
# DE RATON	VERTICAL (l)mm	HORIZONTAL (-- )mm	PROMEDIO
RATON 1	23.25	15.49	19.37
RATON 2	20.95	17.63	19.29
RATON 3	29.79	28.89	29.34

<b>CONTROL – VENENO +DMSO</b>			
# DE RATON	VERTICAL (l)mm	HORIZONTAL (-- )mm	PROMEDIO
RATON 1	27.06	30.78	28.92
RATON 2	35.03	39.22	37.12
RATON 3	22.88	31.56	27.22
RATON 4	25.19	28.85	27.02
RATON 5	28.91	28.26	28.58
RATON 6	26.85	38.08	32.46

<b>PRUEBA EXTRACTO DICLOROMETANO <i>Brongniartia intermedia</i></b>			
# DE RATON	VERTICAL (mm)	HORIZONTAL (mm)	PROMEDIO
RATON 1	27.06	30.78	28.92
RATON 2	35.03	39.22	37.12
RATON 3	22.88	31.56	27.22

<b>PRUEBA EXTRACTO METANOL <i>Brongniartia montalvoana</i></b>			
# DE RATON	VERTICAL (l)mm	HORIZONTAL (-- )mm	PROMEDIO
RATON 1	23.21	37.93	30.5
RATON 2	10.96	19.01	14.98
RATON 3	18.11	6.19	12.15

---

PRUEBA COMPUESTO NEORAUTANO			
# DE RATON	VERTICAL (l)mm	HORIZONTAL (-- )mm	PROMEDIO
RATON 1	13.36	17.83	15.59
RATON 2	13.23	21.29	17.26
RATON 3	18.71	17.64	18.17