



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFECTO DEL LIOFILIZADO DE HOJAS DE *Erythrina americana* EN EL EDEMA PRODUCIDO POR EL VENENO DE
Bothrops asper (NAUYACA)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ANDREA COLIS TORRES

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2017



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

VOCAL

Dra. Beatriz Vázquez Cruz

SECRETARIO

Dra. María Eugenia Garín Aguilar

SUPLENTE

Dr. Gustavo Valencia del Toro

SUPLENTE

**M. en C. Leonor Ana María Abúndiz
Bonilla**

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología (L-514) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Garín Aguilar, el estudio electroforético de las proteínas del veneno de *Bothros asper* en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología y la Cromatografía por HPLC en el Laboratorio de Fitoquímica del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM

A mis sujetos experimentales

A la Dra. María Eugenia Garín Aguilar

Al Dr. Gustavo Valencia del Toro

***Al Dr. Jose Guillermo Ávila Acevedo, a la Dra. Beatriz Vázquez Cruz y a la M.
en C. Leonor Abundiz Bonilla***

Al Dr. Alejandro Carvajal Saucedo

Al M.V.Z Agustín Álvarez Trillo

Al M. en C. Juan Carlos Navarro García

A Angy

A Luis Ángel

A mis amigos de la carrera, especialmente

A mis compañeros de laboratorio

A la vida

DEDICATORIAS

A mi madre Adriana Torres Acevedo

A mi padre Miguel Colis Seelbach

A mi hermano Adrián

A mi abuelita Julia y mis tías y tíos

A mis sobrinos Renata y Sebastián y a mi cuñada Laura

A mis primos

Í N D I C E

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN	14
I.1 Las serpientes.....	14
I.1.1 La familia Viperidae.....	15
I.1.2 <i>Bothrops asper</i>	17
I.1.3 Diagnóstico de accidente ofídico por <i>Bothrops asper</i>	18
I.2 Constituyentes del veneno de <i>Bothrops asper</i>	19
I.2.1 Las metaloproteasas.....	19
I.2.2 Las fosfolipasas A ₂	21
I.3 Reacción inflamatoria.....	23
I.3.1 Inflamación aguda.....	24
I.3.1.1 Cambios vasculares.....	25
I.3.1.2 Acontecimientos celulares:reclutamiento y activación de leucocitos	26
I.3.1.3 Activación de leucocitos.....	29
I.3.1.4 Desenlaces de la inflamación aguda.....	31
I.3.2 Mediadores químicos de la inflamación.....	32
I.3.2.1 Mediadores derivados de las células.....	33
I.3.2.2 Mediadores derivados de las proteínas plasmáticas.....	37
I.3.3 La mionecrosis.....	41
I.3.3.1 Morfología del músculo esquelético.....	41
I.3.4 El dolor.....	46
I.4 El veneno y su papel en la inflamación.....	49
I.4.1 El veneno y su papel en la mionecrosis.....	50
I.4.2 El veneno y su papel en la nocicepción.....	52
I.5 Tratamiento contra la mordedura de serpiente.....	53
I.6 Antivenenos (faboterápico antiviperino).....	53
II. ANTECEDENTES	55
II.1 Antecedentes empíricos.....	55
II.1.1 El género <i>Erythrina</i> contra el accidente ofídico.....	55
II.1.2 <i>Erythrina americana</i> contra el accidente ofídico.....	56
II.2 Antecedentes experimentales.....	56
III. JUSTIFICACIÓN	57
VI. HIPÓTESIS	58
V. OBJETIVOS	58
V.1. Objetivo general.....	58
V.2. Objetivos particulares.....	58
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	59
VI.1. Material vegetal.....	59
VI.2. Preparación de los extractos.....	59
VI.3. Animales.....	59

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

VI.4. Veneno.....	59
VI.5. Bioensayos.....	59
VI.6 Electroforesis del veneno de <i>Bothrops asper</i>	61
VI.6.1. Electroforesis del veneno pre-incubado con liofilizado de hojas de <i>E. americana</i>	61
VI.7 Ensayos químicos del liofilizado de hojas de <i>E. americana</i>	62
VI.8 Análisis estadístico.....	63
VII. RESULTADOS.....	64
VII.1. Material vegetal.....	64
VII.2 Veneno.....	64
VII.2 Bioensayos.....	65
VII.3 Electroforesis del veneno de <i>Bothrops asper</i>	71
VII.3.1 Electroforesis del veneno pre-incubado con liofilizado de hojas de <i>E. americana</i>	72
VII.4 Ensayos químicos del liofilizado de hojas de <i>E. americana</i>	73
VIII. DISCUSIÓN.....	78
IX. CONCLUSIONES.....	94
X. PERSPECTIVAS.....	95
XI. GLOSARIO.....	97
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glándula de veneno de vipéridos.....	16
Figura 2. Distribución porcentual de los envenenamientos ofídicos en Costa Rica, de acuerdo con la región anatómica en la que ocurre la mordedura.....	17
Figura 3. Ejemplar macho de <i>Bothrops asper</i> (Nauyaca) del Zoológico de Zacango, Estado de México.....	18
Figura 4. Clasificación de las metaloproteasas.....	20
Figura 5. Especificidad de las fosfolipasas.....	22
Figura 6. Mecanismo de acción de las fosfolipasas.....	23
Figura 7. Principales manifestaciones locales de la inflamación aguda	25
Figura 8. Proceso de la migración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos, mostrado aquí en relación a los neutrófilos	28
Figura 9. La fagocitosis de una partícula (en el ejemplo se muestra una	

	bacteria) el proceso implica: 1) Reconocimiento y unión; 2) Internalización y 3) Digestión.....	31
Figura 10.	Desenlaces de la inflamación aguda: resolución, cicatrización (fibrosis) o inflamación crónica	32
Figura 11.	Mediadores inflamatorios del aumento de la permeabilidad vascular.....	33
Figura 12.	Generación de los metabolitos del ácido araquidónico y sus funciones en la inflamación. Indicadas por una X en rojo indica las actividades enzimáticas cuya inhibición por medio de una intervención de fármacos bloquea las principales vías. COX-1 y COX-2 son ciclooxigenasa 1 y 2; HETE es ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE es ácido hidroperoxieicosatetraenoico.....	34
Figura 13.	Mediadores derivados de las células. El factor de activación plaquetaria (PAF) deriva de glicerofosfolípidos membranosos que contienen colina. El ácido araquidónico deriva de fosfatos de fosfatidilinositol y de la fosfatidilcolina.....	35
Figura 14.	Activación del factor de Hageman y producción de mediador inflamatorio. La activación del factor de Hageman es un hecho clave que lleva a la conversión de plasminógeno a plasmina, lo que deriva en la generación de productos de la catálisis de fibrina y activa productos del complemento. La activación de la calicreína produce cininas y la activación del sistema de coagulación desemboca en la formación del coágulo.....	37
Figura 15.	Cascada de coagulación.....	38
Figura 16.	Interrelaciones entre los cuatro sistemas mediadores derivados del plasma desencadenados por la activación del factor XII (factor Hageman).....	40
Figura 17.	Revestimientos del músculo esquelético	42
Figura 18.	Composición de las miofibrillas.....	44
Figura 19.	Retículo sarcoplásmico con sus túbulos y cisternas.....	45
Figura 20.	Tres principales tipos de dolor, según su mecanismo fisiopatológico	47
Figura 21.	Dolor inflamatorio.....	48
Figura 22.	Representación esquemática del posible mecanismo de acción de las fosfolipasas A ₂ y metaloproteasas del veneno de <i>Bothrops asper</i> sobre los eventos locales de la reacción inflamatoria.....	50
Figura 23.	Secuencia de eventos degenerativos celulares en músculo esquelético por acción de las fosfolipasas A ₂ presentes en el veneno de <i>Bothrops asper</i>	51

Figura 24.	Representación esquemática del posible mecanismo del sistema nervioso central y periférico implicados en la hiperalgesia y alodinia inducido por las fosfolipasas A ₂ del veneno de <i>Bothrops asper</i>	53
Figura 25.	Inmunoglobulina y sus dos fracciones (Fab y Fc).....	55
Figura 26.	Nauyaca macho del Herpetario Reptilium en el Zoológico de Zacango.....	66
Figura 27.	Pata Derecha con las cantidades de veneno (1.0µg, 1.5µg y 2.0µg) y pata izquierda con 20µL del vehículo (PBS) a las 4.5 h de la inyección de veneno.....	67
Figura 28.	Dosis mínima edematizante (DME) del veneno de <i>Bothrops asper</i> . En el intervalo de una hora. Los resultados se reportan como la media ± ESM. El asterisco (*) indica diferencias significativas, prueba post-hoc de Duncan (p<0.05, n=5).....	68
Figura 29.	Neutralización del edema. Cinética del tiempo en intervalos de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos de duración del experimento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p=0.0001, n= 6).....	70
Figura 30.	Se muestra la pata derecha (PD) y la pata izquierda (PI) del grupo G15 el cual constaba de veneno preincubado con 15 µg de Liofilizado de hojas en 20µL de vehículo. A) vista del perfil de la pata derecha (PD) y B) vista frontal de ambas patas derecha e izquierda.....	71
Figura 31.	Porcentaje de edema a los 60 minutos. Los experimentos se realizaron preincubando cantidades de liofilizado 2-15 µg con la cantidad fija de veneno (1.5 µg) por 30 min a 37°C. Los resultados se reportan como la media ± ESM. Letras diferentes indican diferencias significativas (p=0.0001, n=6).....	72
Figura 32.	SDS-PAGE del veneno de especies de <i>Bothrops asper</i> ; Veneno de dos serpientes del Zoológico de Zacango con distintas concentraciones 0.2 (A), 0.1 (B) y 0.05% (C) y veneno de la serpiente del Zoológico de Chapultepec 0.2 (D), 0.1 (E) y 0.05% (F), junto con el marcador molecular MW (200-2.5 kDa). Señalados por cuadros rojos se observan las bandas con pesos de 116.3, 55.4, 14.4, 3.5 y 2.5 kDa.....	73
Figura 33.	SDS-PAGE del veneno <i>Bothrops asper</i> después de incubado con el liofilizado de hojas de <i>Erythrina americana</i> (1:1, 1:3, 1:5 y 1:10, v/v, 30 min, 37°C), veneno solo (V), suero antiviperino ANTIVIPMYN® solo (S), el suero antiviperino ANTIVIPMYN® incubado con veneno (V:S), marcador molecular MW (200- 2.5 kDa) y la proteína control: proteasa (PROT). Señalados con	

	cuadros rojos se observan los cambios en el patrón electroforético del veneno causados por <i>Erythrina americana</i>).....	74
Figura 34.	Cromatografía en capa fina realizada al liofilizado de hojas de <i>Erythrina americana</i> Mill. Imagen 20A muestra presencia de Taninos (Cloruro férrico), imagen 20B la presencia de compuestos fenólicos (Complejo difenil-ácido bórico-etanoamina-Polietilenglicol) y la imagen 20C la presencia de flavonoides (Solución Folin).....	76
Figura 35.	HPLC de ácido fenólicos realizado al liofilizado de hojas de <i>E. americana</i>	78
Figura 36.	HPLC de flavonoides presentes en el liofilizado de hojas de <i>E. americana</i>	79
Cuadro 1.	Resultados del análisis preliminar fitoquímico del liofilizado de hojas frescas de <i>Erythrina americana</i> Mill.....	75

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

ABREVIATURAS

ARF	Falla renal aguda	CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
SVMPs	Metaloproteasas del veneno de serpientes	NMDA	receptor N-metil D-aspartato
ADAMs	Desintegrinas y Metaloproteasa	LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria
TNF	Factor de necrosis tumoral	PECAM-1	Molécula de adhesión plaqueto-endoteliales
MT-I,II,III,IV	Miotoxinas	CD-18	Antígeno de la familia de las integrinas
Asp	Asparragina	COX-2	Ciclooxigenasa 2
NPM	Neutrófilos polimorfo nucleares	DHL	Deshidrogenasa láctica
MAIC	Moléculas de adhesión intercelular	CK	Creatinquinasa
CAMs	Moléculas de adhesión celular	IgG	Inmunoglobulina
PLA₂	Fosfolipasa A2	DME	Dosis mínima edematizante
PAF	Factor de activación plaquetaria	LD50	Dosis Letal 50
ATP	Adenosin trifosfato	PBS	Buffer salino de fosfatos
NO	Óxido nítrico	Liof	Liofilizado de hojas de <i>Erythrina americana</i>
5-HT	Serotonina	ESM	Error estándar de la media
IL	Interleucina	V	Veneno
NGF	Factor de crecimiento nervioso	MW	Marcadores moleculares

RESUMEN

Las mordeduras de serpientes venenosas pueden llevar a la muerte o discapacidad física. *Bothrops asper* es la serpiente que produce la mayor cantidad de envenenamientos en Centroamérica, específicamente en México se reportan 27,480 accidentes anuales, de los cuales esta especie es responsable de más del 50% de los casos. El único tratamiento científicamente validado es el suero antiviperino, este tratamiento presenta ciertos problemas como son la efectividad limitada para proteger de los daños tisulares, genera reacciones adversas por sus características fisicoquímicas, accesibilidad limitada en las áreas rurales donde la mayoría de los accidentes ocurren; debido a esto es que numerosas plantas son usadas como alternativas terapéuticas para tratar el accidente ofídico. El género *Erythrina* ha sido estudiado desde diferentes perspectivas (efecto anti-inflamatorio, anti-nociceptivo y analgésico); A pesar de que *Erythrina americana* es utilizada empíricamente en Veracruz para combatir los efectos del veneno de serpientes, hasta la fecha no se ha documentado un trabajo de investigación con el género *Erythrina* y la mordedura de serpiente, es por eso que este trabajo de investigación pretendió evaluar el efecto del liofilizado de hojas de *E. americana* Mill. contra el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca). Para lo cual se llevaron a cabo ensayos químicos de la planta, bioensayos (DME y neutralización del edema por el test del edema plantar) y la caracterización del veneno por medio de una electroforesis SDS-PAGE. El liofilizado de hojas de *Erythrina americana* fue eficaz para disminuir el edema y degradar proteolíticamente el veneno de *Bothrops asper*, concluyendo que tiene potencial terapéutico para atender el accidente ofídico.

Palabras clave: *Bothrops*, Edema, *Erythrina*, Fosfolipasas, Veneno, Electroforesis.

I. INTRODUCCIÓN

Las mordeduras de serpientes o accidente ofídico se definen como una lesión cutánea seguida de la inoculación de sustancias tóxicas (veneno) (Zúñiga & Caro, 2013). Las mordeduras de serpientes venenosas producen daño tisular local en forma de hemorragias, edema, mionecrosis y dolor intenso (Neves-Ferreira *et al.*, 1996; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998), efectos sistémicos como alteraciones en el proceso de coagulación y liberación de sustancias farmacológicamente activas como histamina, serotonina y bradicinina (Neves-Ferreira *et al.*, 2000); lo que puede llevar a la muerte o discapacidad física, constituyendo un problema de salud pública internacional. Debido a esto, en el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) por primera vez reconoce a las mordeduras de serpientes venenosas como enfermedades tropicales mal atendidas (Gutiérrez *et al.*, 2010).

En los países con zonas tropicales o subtropicales, ésta es una enfermedad de riesgo para los trabajadores agrícolas (Zúñiga & Caro, 2013).

Se estima que anualmente suceden en el mundo 5 millones de accidentes ofídicos, los cuales causan unas 50,000 muertes (Lizano *et al.*, 2003). México reporta 27,480 accidentes anuales, de los cuales mueren un promedio de 136 personas por año, según los datos de la Dirección General de Estadística (INEGI) (Luna-Bauza, 2007).

En México, la distribución porcentual de las mordeduras es la siguiente: el grupo más afectado es el grupo entre 15-44 años con el 48.75% de los casos; el 64% corresponde al género masculino y el 36% al femenino (Zúñiga & Caro, 2013).

I.1 Las serpientes

Las serpientes se dividen en dos infraórdenes principales: Scolecophidia (serpientes pequeñas fosoriales que se alimentan de hormigas y termitas) y Alethinophidia (serpientes que se alimentan de vertebrados) (Cundall & Greene, 2000; Vidal & Hedges, 2002). Dentro de Alethinophidia, la superfamilia Caenophidia (serpientes avanzadas) usan ampliamente el veneno o la constricción para procurar presas (Vidal & Hedges, 2002; Vidal & David, 2004).

Dentro de la superfamilia Caenophidia se encuentran las familias de serpientes venenosas más importantes para la medicina, clasificadas en las familias Colubridae (*sensu lato*), Atractaspididae, Elapidae y Viperidae.

I.1.1 La familia Viperidae

En nuestro país, la familia Viperidae es causante de casi todos los accidentes, la familia engloba a tres subfamilias: Viperinae, Azemiopinae y Crotalinae. En México, sólo se encuentran distribuidas especies de la subfamilia Crotalinae, subfamilia integrada por las serpientes de cascabel (*Crotalus*), las nauyacas (*Bothrops*, *Brotiechis*, *Porthidium*) y los cantiles (*Agkistrodon*) (Zúñiga & Caro, 2013). Los crotalinos poseen un par de fosetas termorreceptoras, ubicadas entre el ojo y los orificios nasales, y presentan dentición solenoglifa, es decir, presentan colmillos móviles por la acción de músculos especializados.

El veneno es una secreción de toxinas que se sintetiza en una glándula especializada y se expulsa mediante un sistema especializado (Vonk *et al.*, 2008); la glándula principal contiene un epitelio secretor de veneno, el cual es almacenado en el lumen de la glándula y, que posteriormente se transporta del conducto primario hacia la glándula accesoria, desde ahí pasa al conducto secundario hasta los colmillos, los cuales poseen un canal interno con un orificio en su parte terminal (Figura 1) (Klauber, 1956). Durante el ataque de una serpiente ocurre una presurización de la glándula por medio del músculo compresor, forzando a que un bolo de veneno pase por los conductos hacia la presa. Los vipéridos controlan el volumen de veneno que inocularán a sus presas o depredadores e incluso pueden, como medida de “advertencia”, morder sin inocular veneno (Neri-Castro *et al.*, 2014).

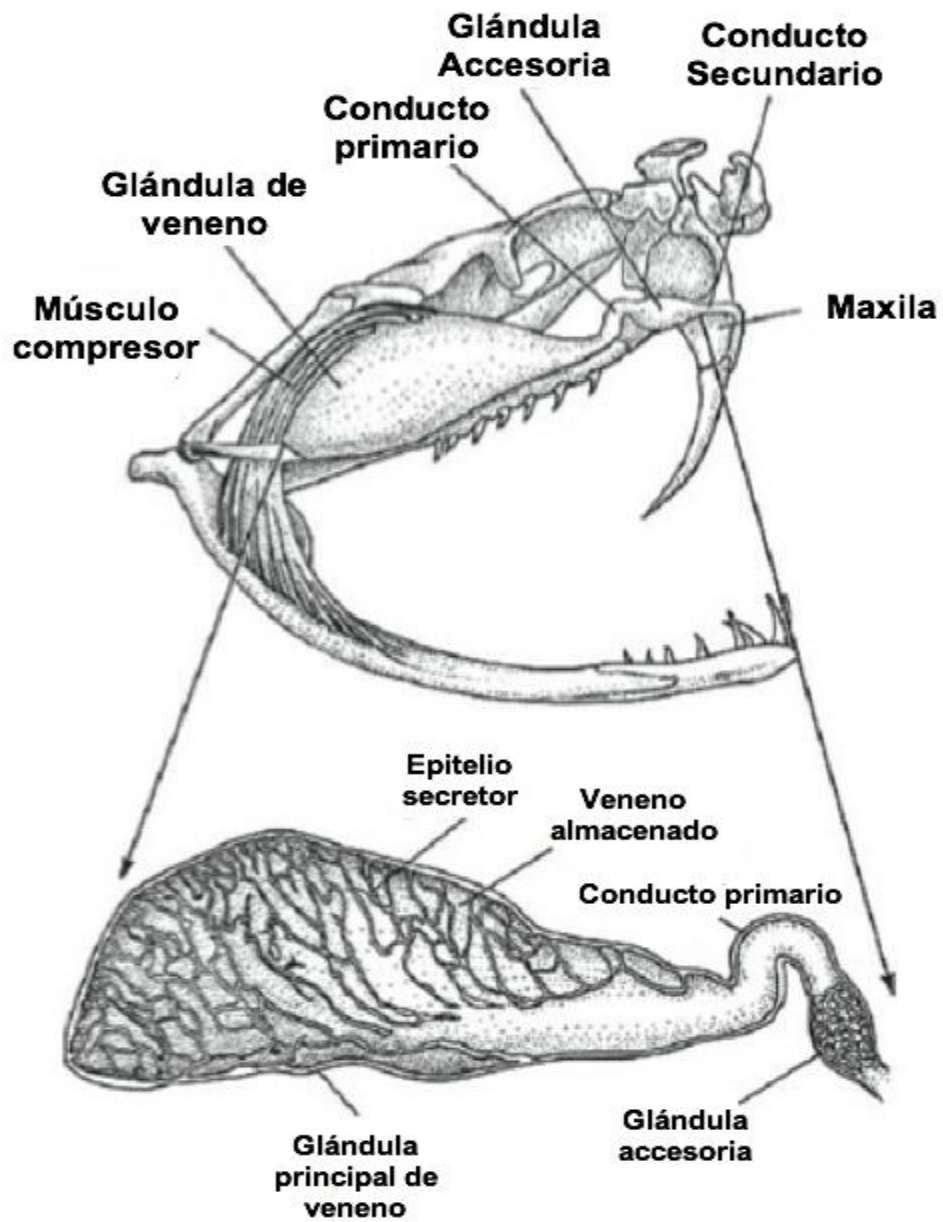


Figura 1. Glándula de veneno de viperinos. Modificado de Mackessy (1991).

I.1.2 *Bothrops asper*

Dentro de las serpientes, *Bothrops asper* produce la mayor cantidad de envenenamientos en el sureste de México, América central y las zonas norte de Sudamérica (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Warrell, 2004). Se estima que, en regiones centroamericanas, *B. asper* es responsable de más del 50% de los casos de accidente ofídico, y de casi todos los desenlaces fatales (Bolaños, 1982; Gutiérrez & Lomonte, 1995). Esto se debe a varios factores, por ejemplo, la amplia distribución de la especie en terrenos bajos húmedos dedicados a las actividades agrícolas, a la capacidad de adaptación de la especie ante ambientes perturbados, como zonas agrícolas y pasturas (Savage, 2002; Solórzano, 2004) y al consecuente contacto cercano que existe entre *B. asper* y los humanos. Esta especie es irritable, rápida e impredecible puede llegar a crecer hasta 250 cm e inflige mordidas en cualquier región anatómica, incluyendo arriba de la rodilla (Figura 2), ocasionando síntomas locales y sistémicos severos (Hardy, 1994; Warrell, 2004).

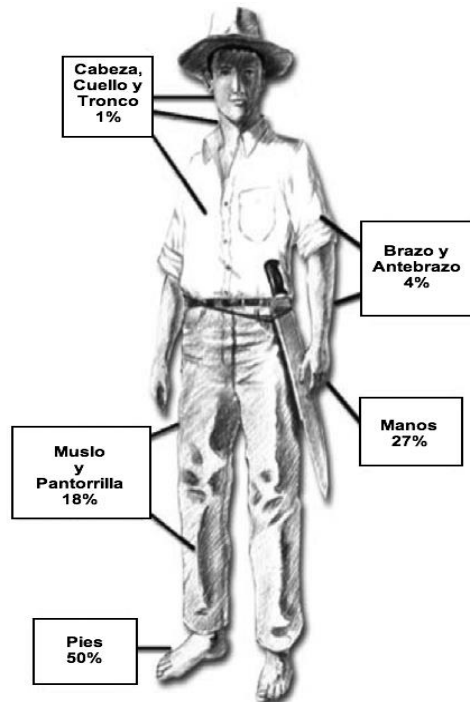


Figura 2. Distribución porcentual de los envenenamientos ofídicos en Costa Rica, de acuerdo con la región anatómica en la que ocurre la mordedura. Modificado de Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas (2011).

Bothrops asper es popularmente conocida como cuatronarices, equis, mapaná, rabiseca, boquidorá, damá (Grupo étnico Embera) ó tapa (Grupo étnico Cuna) en Colombia; cuatronarices, equis pachona, equis rabo de hueso y pudridora en Ecuador; equis en Panamá; terciopelo, nauyaca y barba amarilla en Centro América (Otero, 1994; Campbell & Lamar, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2006) (Figura 3).



Figura 3. Ejemplar macho de *Bothrops asper* (Nauyaca) del Zoológico de Zacango, Estado de México. Foto tomada por Colis-Torres, A.

El impacto de *B. asper* en la salud pública y otros aspectos de la vida en la región centroamericana es bien sabida desde la época de las culturas precolombinas una de las cuales nombró a esta serpiente ‘Bec-Kara-Acà’, ‘el diablo que trae consigo la muerte cuando muere’ (Picado, 1931).

I.1.3 Diagnósis de accidente ofídico por *Bothrops asper*

El cuadro clínico del envenenamiento por *Bothrops asper* incluyen edema en el 95 % de los casos, considerado como signo clásico de envenenamiento bothrópico

local, detectable a los 5 minutos después de la mordida; hemorragia local en el 34% de los casos, evidente como sangrado o equimosis durante los primeros 5 a 30 minutos; ámpulas en el 12% de los casos, dermonecrosis y mionecrosis en el 10% de los casos, evidente a las 6 u 8 horas después del accidente. La progresión y extensión del edema y la presencia de necrosis definen el grado local de envenenamiento. Alteraciones en la coagulación sanguínea, sangrados y la presencia de complicaciones mortales como son shock, falla renal aguda (ARF), síndrome compartimental, hemorrágias del sistema nervioso central y daño de órganos vitales definen el grado sistémico de envenenamiento (Otero, 2007).

Las variaciones ontogénicas de la composición del veneno tienen implicaciones en las manifestaciones clínicas de los envenenamientos. Debido a que el veneno de los especímenes adultos tiene un alto contenido en fosfolipasas A₂ (Alape-Girón *et al.*, 2008), las mordeduras por especímenes grandes aproximadamente de un metro de longitud (adultos) de *B. asper* involucran un riesgo más alto de envenenamiento severo con dermonecrosis y mionecrosis (Otero *et al.*, 2002; Otero, 2007; Otero-Patiño *et al.*, 1998).

I.2 Constituyentes del veneno de *Bothrops asper*

El veneno de *Bothrops asper*, así como de la mayoría de los vipéridos, está constituido por proteasas dentro de este grupo se encuentran las metaloproteasas y las serinoproteasas.

I.2.1 Las metaloproteasas

Las metaloproteasas del veneno de serpientes (SVMPs) pertenecen junto con las proteínas aisladas de una variedad de organismos incluyendo mamíferos, reptiles e invertebrados (ADAMs), a la subfamilia M12 de las reprotinas al compartir dominios metaloproteasa homólogos (Bjarnason and Fox, 1995; Fox & Long, 1998). Todas las metaloproteasas del veneno de serpientes (SVMPs) comparten pre-dominios, pro-dominios y dominios proteasa entre sí. En el dominio proteasa, las SVMPs presentan enlaces dobles o triples disulfuro. Las metaloproteasas se

clasifican en cuatro grupos diferentes P-I a P-IV, dependiendo de su composición (Figura 4).

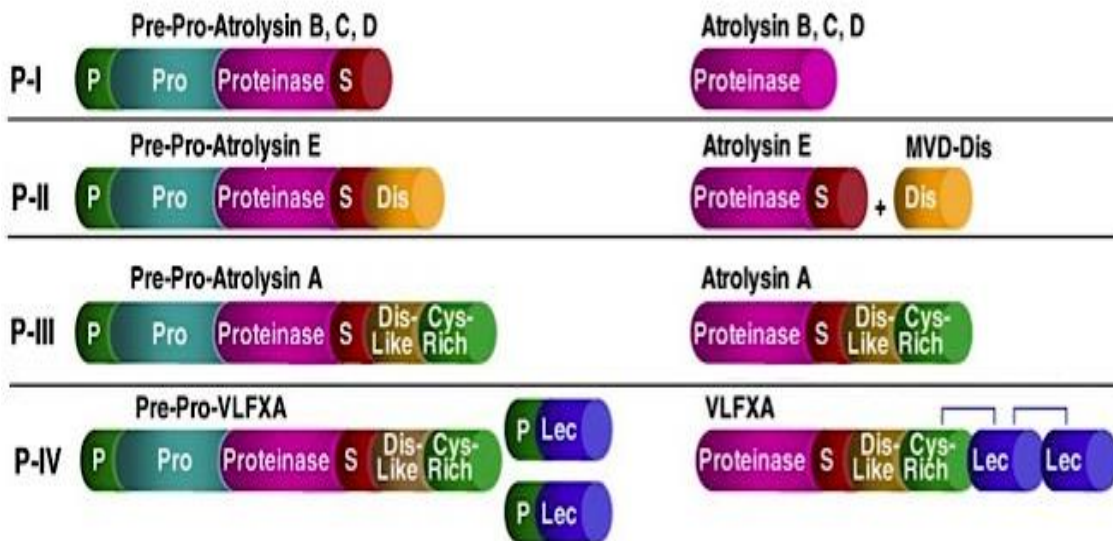


Figura 4. Clasificación de las metaloproteasas. Modificado de Fox & Serrano (2005).

El grupo P-I comprende enzimas que presentan un dominio metaloproteasa con sitio de unión zinc. Grupo P-II incluye enzimas con dominio metaloproteasa y con dominio desintegrina. SVMPs pertenecientes al grupo P-III presentan un dominio metaloproteasa, desintegrina y dominios ricos en cisteína en una cadena polipeptídica, algunos de ellos glicosilados. Finalmente, el grupo P-IV son heterodímeros, con una subunidad correspondiente a una cadena P-III y una subunidad con dominio lectina. Los grupos P-I y P-III fueron aislados del veneno de *B. asper*, en los especímenes adultos la concentración de SVMPs del grupo P-I es mayor que la concentración de P-III (Alape-Girón *et al.*, 2008).

Los dominios desintegrina de estas proteínas son considerados capaces de adherirse a receptores de integrina y de esta manera producir una doble función; dirigiendo la toxina a una superficie específica de la célula y bloqueando la unión de ligandos normales (Fox & Serrano, 2005). El papel de los dominios ricos en cisteína ha sido menos investigado que el papel del dominio desintegrina, no obstante,

diversos trabajos han demostrado las actividades funcionales. Jia *et al.* (2000) demostraron que el dominio rico en cisteína es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria estimulada por colágeno, además de adherirse eficientemente al colágeno.

Las serinoproteasas juegan un papel en la activación de metaloproteasas endógenas y son procoagulantes (Saravia-Otten *et al.*, 2004). Las proteasas de serina ó serinoproteasas degradan proteínas extracelulares, restos celulares y bacterias. Aunque las serinoproteasas son más importantes en la digestión de las moléculas de la membrana extracelular, también modifican la actividad de las citocinas (TNF- α e interleucinas) puesto que las solubilizan y modifican a los receptores unidos a la membrana cortando las citocinas activas de los precursores inactivos. También separan a las citocinas de sus receptores localizados en la superficie celular y de este modo regulan la bioactividad de las citocinas (Murphy, 2012).

I.2.2 Las fosfolipasas A₂

El otro gran componente del veneno de *Bothrops asper* son las fosfolipasas A₂. Las fosfolipasas son representativas de las enzimas solubles en agua que se asocian con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana para realizar sus funciones catalíticas. Las fosfolipasas reciben su nombre dependiendo del enlace que hidrolizan, al escindir el fosfolípido en la posición sn-2, las fosfolipasas del veneno se conocen como fosfolipasas A₂ (Figura 5).

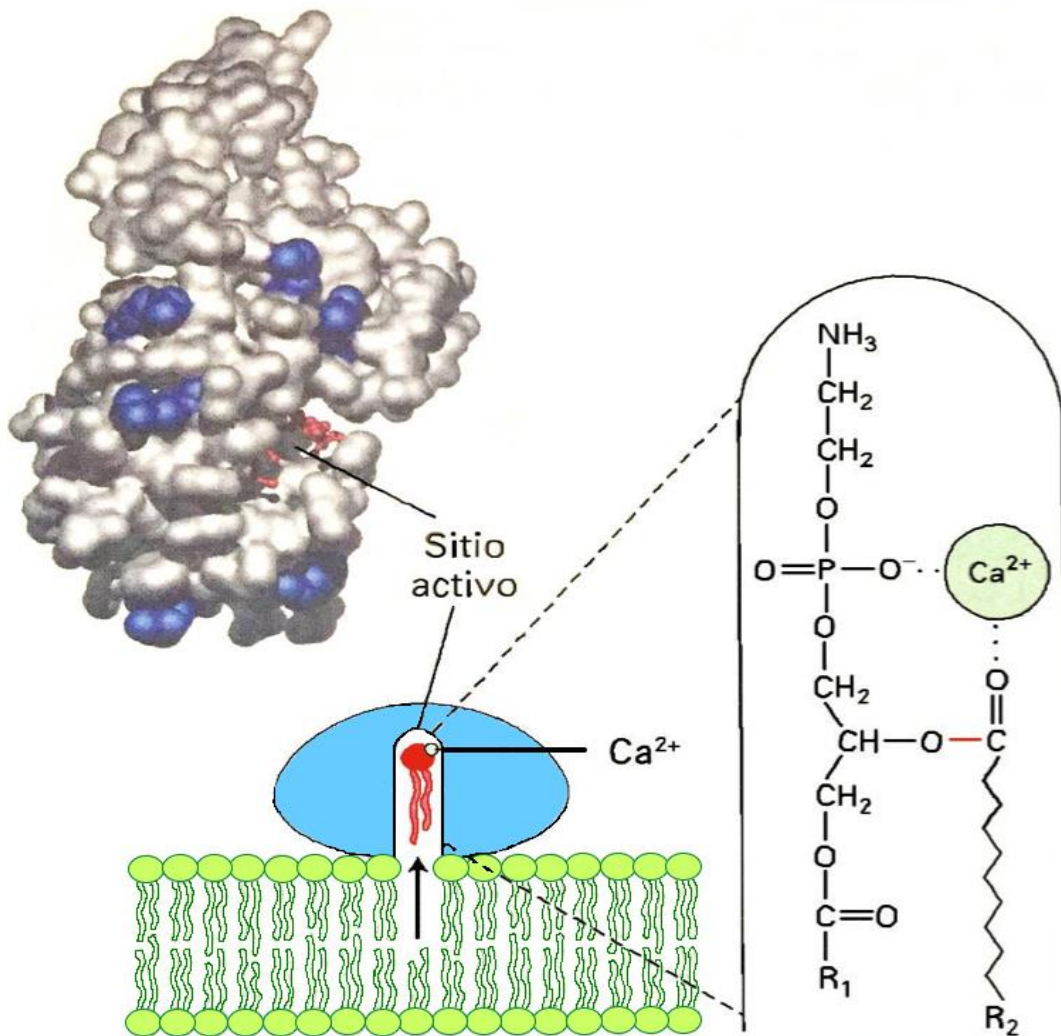


Figura 6. Mecanismo de acción de las fosfolipasas. Tomado de Lodish *et al.* (2012).

Cuatro miotoxinas fosfolipasas A_2 se aislaron del veneno de *B. asper* (MT-I a MT-IV). MT-II y MT-IV carecen de actividad catalítica y presentan un residuo Lys en la posición 49, mientras que las miotoxinas MT-I y MT-III tienen una potente actividad enzimática, y contienen un residuo Asp en la posición 49 (Lomonte & Carmona, 1992; Gutiérrez & Lomonte, 1995).

I.3 Reacción inflamatoria

El envenenamiento por serpientes viperinas y crotálicas desencadena en la mayoría de los casos una reacción inflamatoria (Rosenfeld, 1971; Sawai, 1980). El veneno

de *Bothrops asper* provoca una reacción inflamatoria pronunciada en el sitio de inyección en humanos y animales de experimentación (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez *et al.*, 1986).

La inflamación es una reacción, tanto sistemática como local, de los tejidos y la microcirculación frente a una agresión patógena (Kumar *et al.*, 2008). Las células y las moléculas de defensa del huésped circulan normalmente por la sangre, y el objetivo de la reacción inflamatoria es llevarlas al sitio de la infección o del daño tisular (Murphy, 2012). Esta respuesta localiza y elimina células alteradas, partículas extrañas, microorganismos y antígenos y prepara el camino para el retorno de la normalidad estructural y funcional. Los signos clínicos de la inflamación son rubor (enrojecimiento), calor (calentura), tumor o tumefacción (hinchazón) y dolor (Kumar *et al.*, 2008).

La inflamación puede ser aguda o crónica. La **inflamación aguda** tiene un comienzo rápido y corta duración, que va de pocos minutos a varios días y se caracteriza por exudación de líquido y proteínas plasmáticas y acumulación predominante de leucocitos polimorfonucleares. La **inflamación crónica** tiene una mayor duración de días a años y se caracteriza por el aflujo de linfocitos y macrófagos con proliferación vascular y fibrosis (cicatrización) (Murphy, 2012).

I.3.1 Inflamación aguda

Todas las reacciones inflamatorias agudas siguen una secuencia bastante estereotípica; inmediatamente en respuesta a una lesión o traumatismo, con rapidez y de manera transitoria, los vasos sanguíneos se contraen y luego se dilatan (Kumar *et al.*, 2008). Las reacciones inflamatorias agudas pueden ser desencadenadas por varios estímulos: Las infecciones (bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias), los traumatismos (contusos y penetrantes) y los agentes físicos y químicos (lesión térmica, radiación), la necrosis tumoral (isquemia), cuerpos extraños (astillas, suciedad, suturas), reacciones inmunitarias.

La inflamación aguda tiene dos componentes principales:

Cambios vasculares: alteraciones en el calibre vascular que dan lugar a un aumento del flujo sanguíneo (vasodilatación) y a cambios estructurales que permiten a las proteínas plasmáticas abandonar la circulación (aumento de la permeabilidad vascular)

Acontecimientos celulares: migración de los leucocitos de la microcirculación y acumulación en el foco de lesión (reclutamiento y activación celulares). Los leucocitos principales en la inflamación aguda son los neutrófilos (Murphy, 2012).

I.3.1.1 Cambios vasculares

Los cambios en los vasos sanguíneos comienzan rápidamente después de la lesión. Después de una vasoconstricción transitoria que dura segundos se produce vasodilatación arteriolar, lo que da lugar a un aumento localizado del flujo de sangre. Esta expansión vascular es la causa del enrojecimiento (eritema) y aumento del calor. A medida que la microvasculatura se vuelve más permeable, el líquido rico en proteínas pasa a los tejidos extravasculares (Figura 7).

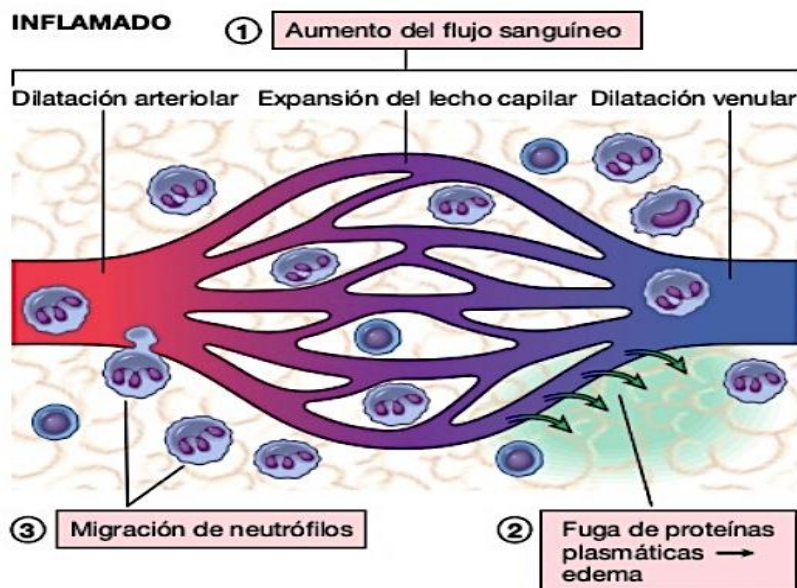


Figura 7. Principales manifestaciones locales de la inflamación aguda. Tomado de Kumar *et al.* (2008).

Se origina así una mayor concentración de los eritrocitos, aumentando por consiguiente la viscosidad de la sangre y produciendo un enlentecimiento de la circulación, proceso denominado estasis (Murphy, 2012). Luego de la lesión, los mediadores vasoactivos se unen a receptores específicos de las células endoteliales, lo que causa la contracción reversible de la célula endotelial y la formación de brechas intercelulares (Kumar *et al.*, 2008). Esa ruptura de la barrera endotelial condiciona la extravasación (fuga) de líquidos intravasculares hacia el espacio extravascular. La lesión leve y directa del endotelio provoca una respuesta bifásica: en el período de los 30 minutos siguientes a la lesión se produce un cambio temprano en la permeabilidad, seguido por un segundo aumento de la permeabilidad vascular después de 3 a 5 h. Cuando el daño es serio, la exudación de líquido intravascular hacia el espacio extravascular se incrementa de forma progresiva y alcanza el pico 3 a 4 h después de la lesión (Kumar *et al.*, 2008). Citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1) pueden inducir una retracción más lenta y más prolongada de las células endoteliales debido a cambios en el citoesqueleto (Murphy, 2012).

I.3.1.2 Acontecimientos celulares: reclutamiento y activación de leucocitos

Los leucocitos ingieren los agentes causales, destruyen las bacterias y otros microbios, y eliminan el tejido necrótico y las sustancias extrañas.

La secuencia de acontecimientos en el reclutamiento de los leucocitos a partir de la luz vascular al espacio extravascular consta de: 1) marginación, adhesión al endotelio y rodamiento a lo largo de la pared vascular; 2) firme adhesión al endotelio; 3) transmigración entre las células endoteliales, y 4) migración en los tejidos intersticiales debido a un estímulo quimiotáctico (Murphy, 2012).

Marginación y rodamiento. Al fluir la sangre de los capilares a las vénulas poscapilares, las células circulantes son lanzadas por el flujo laminar contra la pared vascular. Además, los eritrocitos tienden a moverse más rápidamente que los leucocitos, de mayor tamaño. Como consecuencia, los leucocitos son empujados

fuera de la columna axial central y tienen así una mejor oportunidad de interactuar con las células endoteliales. Este proceso de acumulación leucocitaria en la periferia se conoce como *marginación*. Posteriormente, los leucocitos ruedan sobre la superficie endotelial proceso que recibe la denominación de *rodamiento*. Las débiles y transitorias adhesiones están mediadas por la familia de moléculas de adhesión selectinas (Murphy, 2012) (Figura 8).

Selectinas

Las selectinas son receptores expresados en los leucocitos y en el endotelio, la familias de las selectinas incluye a la selectina P, la selectina E y la selectina L (Murphy, 2012).

La selectina P (CD62P, GMP-140, PADGEM) se preforma y almacena dentro de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas. Bajo la estimulación con histamina, trombina o citocinas inflamatorias específicas, la selectina P se transporta con rapidez a la superficie celular, donde se une a la sialil-Lewis X de la superficie leucocitaria.

La selectina E (CD62E, ELAM-1) no se expresa de manera habitual sobre la superficie de las células endoteliales, pero los mediadores inflamatorios como las citocinas (IL-1 y TNF- α) o el lipopolisacárido bacteriano la inducen. La selectina E influye la adhesión de neutrófilos, monocitos y ciertos linfocitos mediante la unión al factor de Lewis X o de Lewis A.

La selectina L (CD62L, LAM-1, Leu-8) une los linfocitos a las vénulas del endotelio alto del tejido linfoide, y de este modo regula su paso a través de este tejido. La selectina L se une a la molécula 1 de adhesión celular portadora de glucano (GlyCAM-1), a la molécula 1 de adhesión celular de la adreína mucosa (MadCAM-1) y a CD-34 (Kumar *et al.*, 2008).

Adhesión y transmigración. La siguiente etapa en la reacción de los leucocitos es una firme adhesión a las superficies endoteliales. Esta adhesión se halla mediada por integrinas expresadas en las superficies celulares de los leucocitos que

interactúan con sus ligandos en las células endoteliales. Las integrinas se expresan normalmente sobre las membranas plasmáticas de los leucocitos en un estado de baja afinidad, cuando los leucocitos adherentes se encuentran con quimiocinas, las células se activan y sus integrinas sufren cambios en su conformación y se agrupan, convirtiéndose así en una forma de gran afinidad. Al mismo tiempo, otras citocinas sobre todo TNF- α e IL-1, activan las células endoteliales para aumentar su expresión de ligandos para integrinas. Estos ligando incluyen MAIC-1, que se une a las integrinas LFA-1 (CD-11a/CD-18) y Mac-1(CD11b/CD18) y MACV-1 que se une a la integrina VLA-4 (Murphy, 2012). Después de ser detenidos, los neutrófilos migran a través de la pared vascular principalmente al escurrirse entre las células, este movimiento es denominado *diapédesis*. La migración de los neutrófilos es accionada por las quimiocinas producidas en los tejidos extravasculares. Además, MAPCE-1 (CD-31) media en la unión de los acontecimientos requeridos para que los leucocitos atravesen el endotelio. Después de atravesarlo, los leucocitos cruzan las membranas basales vasculares degradándolas con colagenasas segregadas (Murphy, 2012) (Figura 8).

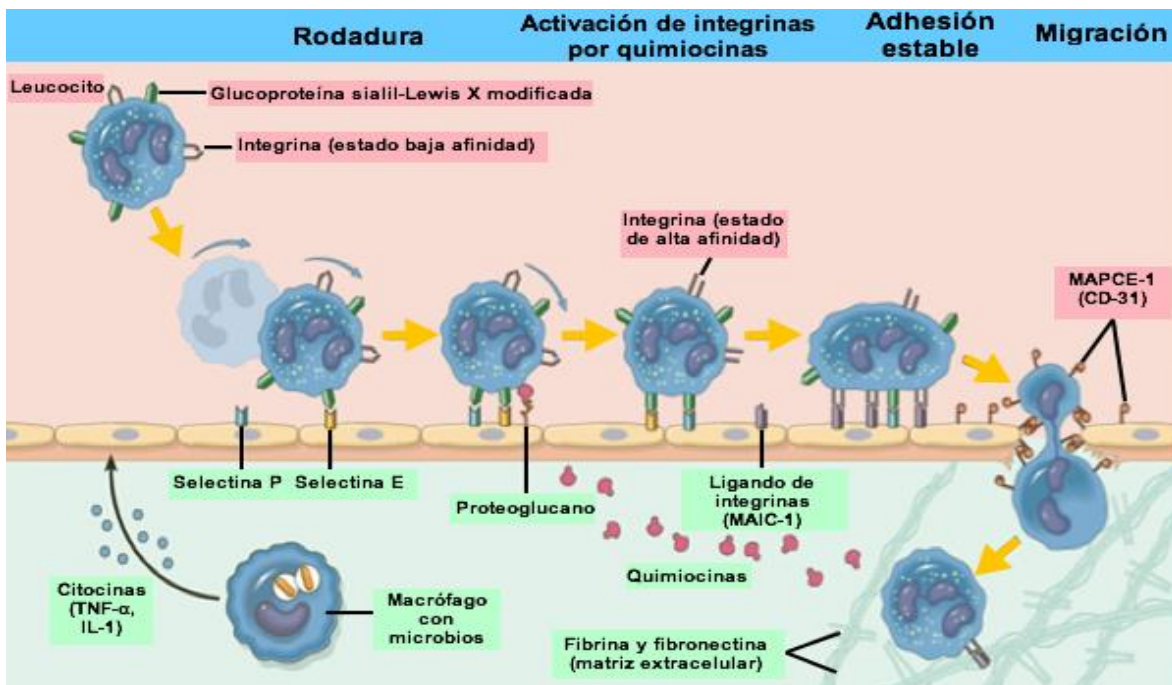


Figura 8. Proceso de la migración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos, mostrado aquí en relación a los neutrófilos. Modificado de Kumar *et al.* (2008).

Quimiotaxis. Es un proceso dinámico y dependiente de energía que dirige la migración celular. Las células endoteliales liberan sustancias quimiotácticas para reclutar leucocitos de la sangre. Luego, migran desde el endotelio hacia el tejido objetivo bajo el gradiente de una sustancia quimiotáctica en respuesta a un segundo gradiente quimiotáctico más distal. Los factores más importantes para los neutrófilos son componentes del sistema del complemento (C5a), productos bacteriano y mitocondriales, sobre todo péptidos N-formilados, productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA), sobre todo leucotrieno B₄ (LTB₄), quimiocinas y productos de la degradación de la matriz extracelular (Kumar *et al.*, 2008).

Las moléculas quimiotácticas se unen a receptores específicos de la superficie celular (proteínas G transmembranales), algunas de las cuales llevan a un aumento del calcio citosólico, lo que desencadena el ensamblaje de los elementos citoesqueléticos contráctiles necesarios para el movimiento. Los leucocitos se mueven extendiendo sus *pseudópodos* que se anclan a la matriz extracelular (Murphy, 2012). El coctel de quimiocinas que se presenta en un tejido determina en gran medida el tipo de leucocitos que se atraen hacia la zona de lesión (Kumar *et al.*, 2008). En la mayoría de las formas de inflamación aguda predominan los neutrófilos en el infiltrado inflamatorio durante las primeras 6 a 24 horas y son sustituidos por monocitos de las 24 a 48 horas. Los neutrófilos son más numerosos en sangre, responden rápidamente a las quimiocinas, y pueden unirse más firmemente a las moléculas de adhesión, como las selectinas P y E (Murphy, 2012).

I.3.1.3 Activación de leucocitos

Muchas células inflamatorias (monocitos, macrófagos hísticos, células dendríticas y neutrófilos) reconocen, internalizan y digieren el material extraño, los microorganismos o los restos celulares por un proceso llamado **fagocitosis**.

El complejo proceso incluye una secuencia de suceso transmembrana y de señalización intracelular: 1) Reconocimiento 2) Internalización y 3) Digestión (Kumar *et al.*, 2008).

Reconomiento.

Los neutrófilos se unen a la mayoría de los agentes extraños y los ingieren a través de receptores de superficie específicos denominados *opsoninas*, que recubren los microbios y los toman como diana para la fagocitosis (proceso denominado *opsonización*). Las opsoninas más importantes son anticuerpos de la clase inmunoglobulina IgG o C3b. Los neutrófilos expresan receptores opsónicos específicos, como son el receptor Fc para la IgG (FcγR1), receptores 1 y 3 del complemento (CR1 y CR3) para fragmentos del complemento, y C1q para las colectinas (Murphy, 2012) (Figura 9).

Internalización.

Se extienden pseudópodos alrededor de la diana, formando una vacuola fagocítica. A continuación, la membrana de la vacuola se fusiona con la membrana de un gránulo lisosómico, lo que da lugar a la descarga de los contenidos de los gránulos en una vacuola denominada *fagolisosoma* (Murphy, 2012) (Figura 9).

Digestión.

La culminación de la fagocitosis de los microbios es la destrucción y degradación de las partículas ingeridas, dentro del fagolisosoma mediante la producción de sustancias microbicidas. Las sustancias microbicidas más importantes son las especies reactivas de oxígeno (ROS); y las enzimas lisosómicas. Los microorganismos muertos son degradados a continuación por la acción de hidrolasas ácido lisosómicas (Murphy, 2012) (Figura 9).

1. RECONOCIMIENTO Y UNIÓN

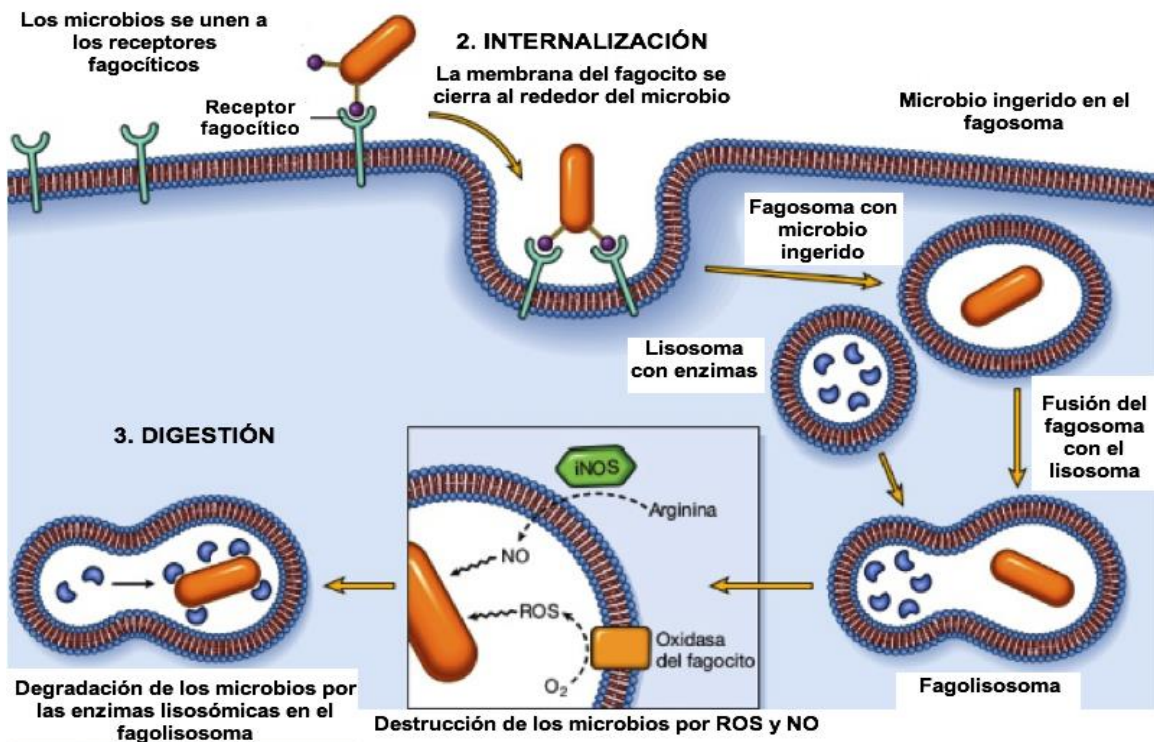


Figura 9. La fagocitosis de una partícula (en el ejemplo se muestra una bacteria) el proceso implica: 1) Reconocimiento y unión; 2) Internalización y 3) Digestión. Modificado de Kumar *et al.* (2008).

I.3.1.4 Desenlaces de la inflamación aguda

Aunque las consecuencias de la inflamación aguda se modifican por la naturaleza e intensidad de la lesión, el sitio y tejido afectados, la inflamación aguda tiene, generalmente, uno de tres desenlaces:

Resolución. Implica la neutralización, descomposición o degradación enzimática de los diversos mediadores químicos, la normalización de la permeabilidad vascular y el cese de la migración leucocitaria con la posterior apoptosis de los neutrófilos extravasados. Además, se comienzan a producir mediadores que inhiben la inflamación.

Progresión a la inflamación crónica. Puede seguir si no se elimina el agente causal.

Cicatrización o fibrosis. Es la consecuencia de una destrucción tisular sustancial o cuando se produce la inflamación en tejidos que no se regeneran. Además, los exudados fibrinosos extensos, debido al aumento de la permeabilidad vascular,

pueden no ser absorbidos completamente y son organizados por crecimiento de tejido conjuntivo lo que resulta en una fibrosis (Murphy, 2012) (Figura 10).

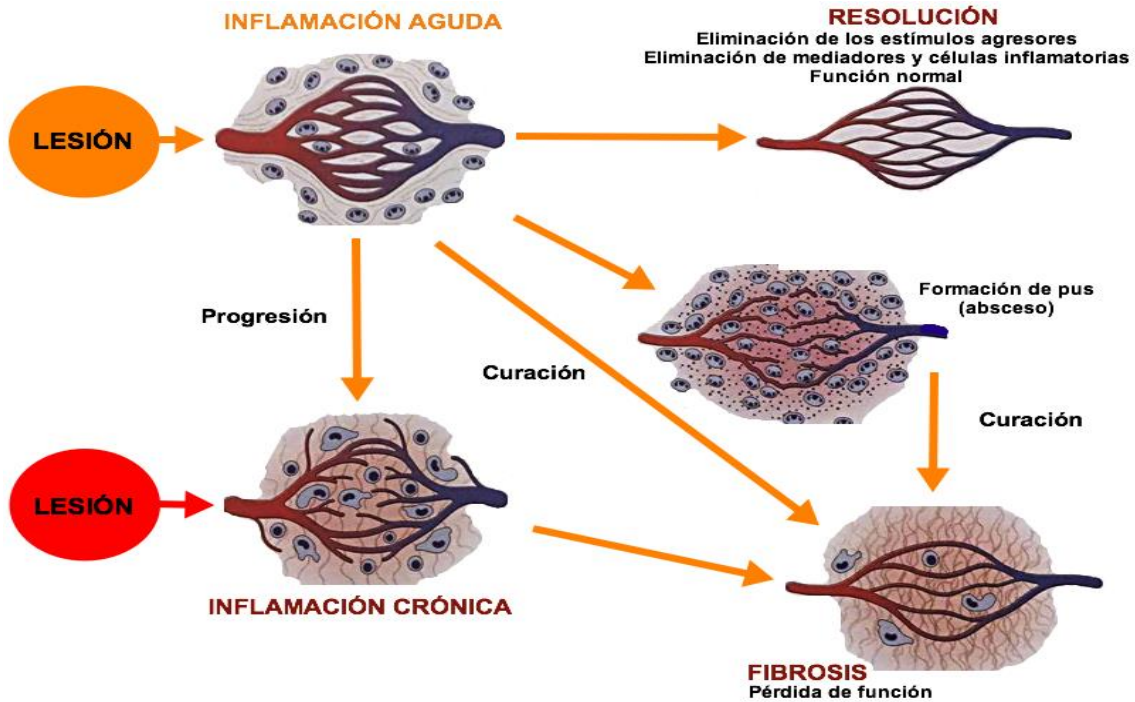


Figura 10. Desenlaces de la inflamación aguda: resolución, cicatrización (fibrosis) o inflamación crónica. Modificado de Kumar *et al.* (2008).

I.3.2 Mediadores químicos de la inflamación

Los mediadores pueden ser derivados de las células o pueden ser derivados de proteínas plasmáticas.

Los mediadores derivados de las células se hallan secuestrados en gránulos intracelulares y son secretados rápidamente con la activación celular.

Los mediadores derivados de proteínas plasmáticas sufren habitualmente una escisión proteolítica para adquirir sus actividades biológicas (Murphy, 2012) (Figura 11).

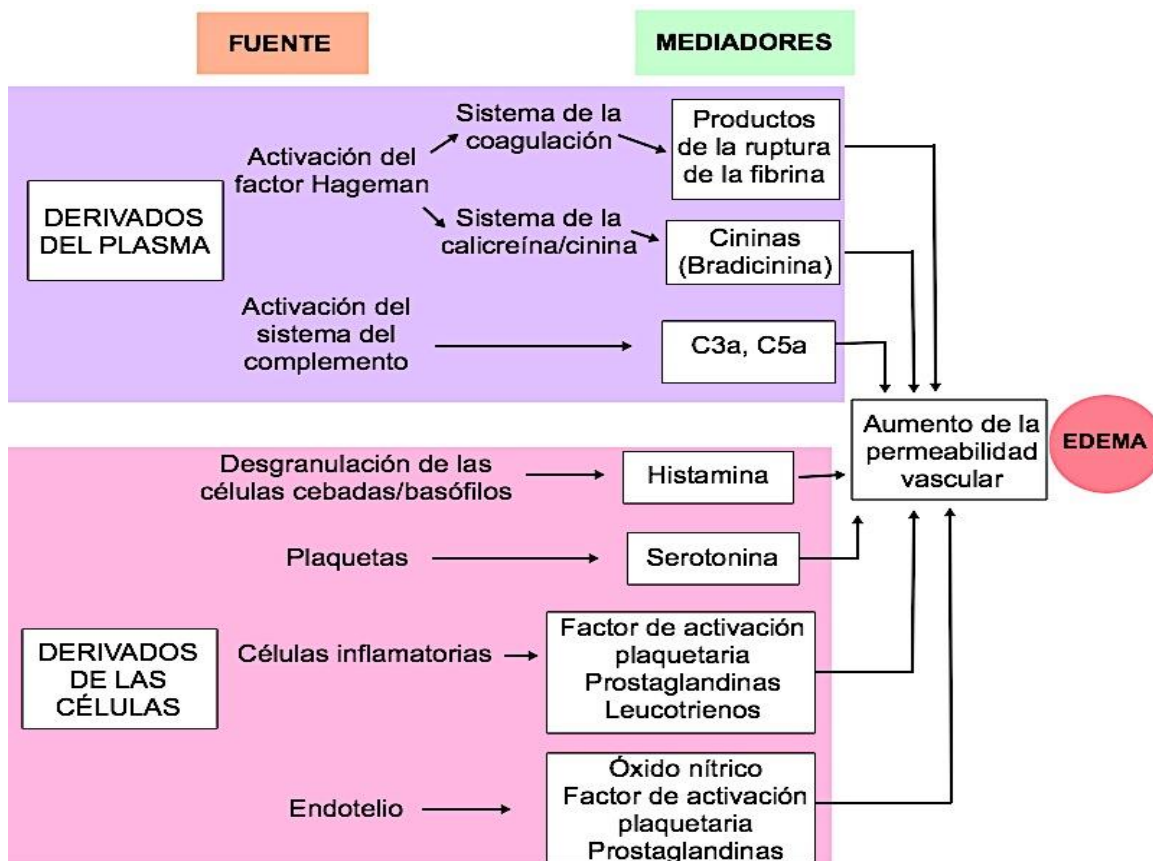


Figura 11. Mediadores inflamatorios del aumento de la permeabilidad vascular. Modificado de Murphy (2012).

I.3.2.1 Mediadores derivados de las células

Las plaquetas, basófilos, neutrófilos, células endoteliales, monocitos/macrófagos, células cebadas hísticas y tejidos dañados que son circulantes son fuentes celulares de mediadores vasoactivos.

En términos generales, los mediadores son 1) derivados del metabolismo de los fosfolípidos y del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, lipoxinas) y factor de activación plaquetaria (PAF); 2) gránulos citoplasmáticos preformados y almacenados (histamina, serotonina e hidrolasas lisosómicas), o 3) derivados de la producción alterada de reguladores normales de la función vascular (óxido nítrico y neurocininas) (Murphy, 2012).

1) Derivados del metabolismo de los fosfolípidos y del ácido araquidónico

De acuerdo con la célula inflamatoria específica y la naturaleza del estímulo, las células activadas producen ácido araquidónico por una de dos posibles vías. Una vía incluye la liberación de ácido araquidónico a partir del glicerol estructural de los fosfolípidos de la membrana celular (fosfatidilcolina) por activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La otra vía es el metabolismo del fosfato de fosfatidilinositol a diacilglicerol y fosfato de inositol por la fosfolipasa C. Entonces, la lipasa separa el ácido araquidónico del diacilglicerol. Una vez generado, el ácido araquidónico se metaboliza de manera adicional a través de dos vías: 1) Ciclooxygenación, con producción subsiguiente de prostaglandinas y tromboxano, y 2) Lipooxygenación, para formar leucotrienos y lipoxinas (Murphy, 2012) (Figura 12).

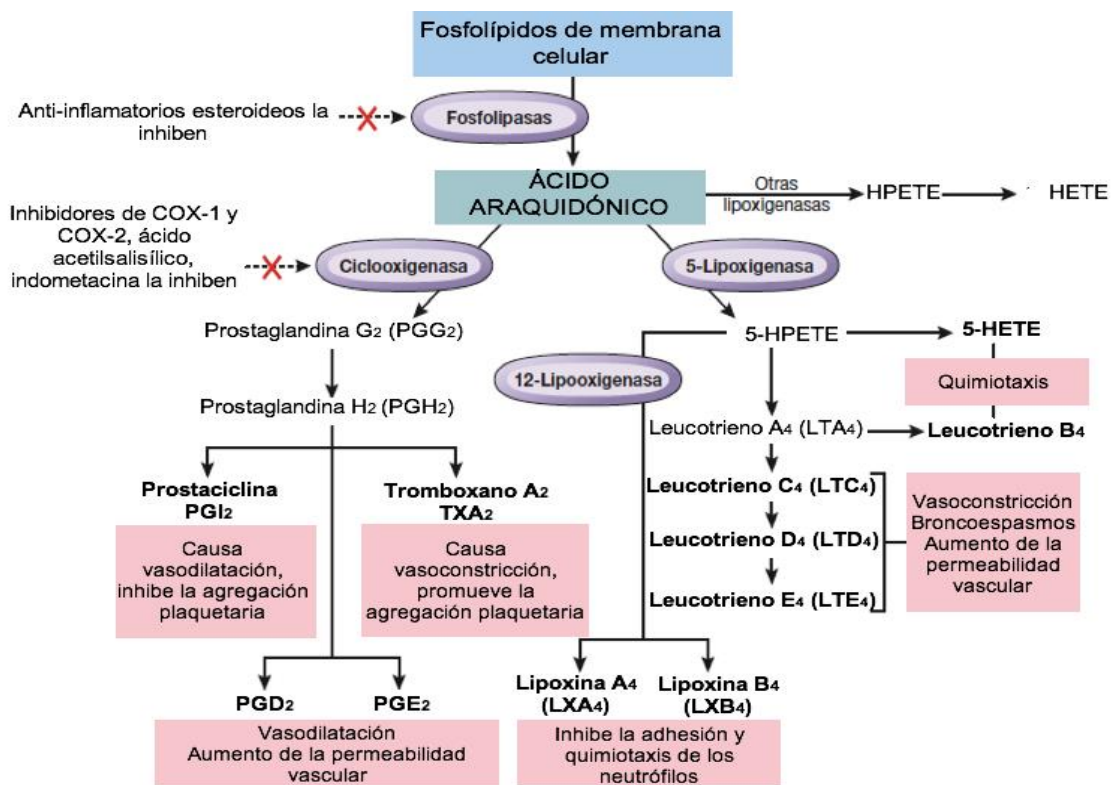


Figura 12. Generación de los metabolitos del ácido araquidónico y sus funciones en la inflamación. Indicadas por una X en rojo indica las actividades enzimáticas cuya inhibición por medio de una intervención de fármacos bloquea las principales vías. COX-1 y COX-2 son ciclooxigenasa 1 y 2; HETE es ácido hidroxicicosatetraenoico; HPETE es ácido hidroperoxicicosatetraenoico. Modificado de Kumar *et al.* (2008).

Factor de activación plaquetaria

El factor de activación plaquetaria (PAF) es otro derivado de los fosfolípidos de membrana. Durante la respuesta inflamatoria, el PAF deriva de los glicerofosfolípidos que contienen colina en la membrana celular, de manera inicial por la acción catalítica de la fosfolipasa A₂, seguido por una acetilación llevada a cabo por una acetiltransferasa. El PAF estimula plaquetas, neutrófilos, monocitos/macrófagos, células endoteliales y células vasculares del músculo liso. El PAF induce la agregación plaquetaria y la desgranulación en los lugares de daño hístico y aumenta la liberación de serotonina, por lo que altera la permeabilidad vascular (Murphy, 2012) (Figura 13).

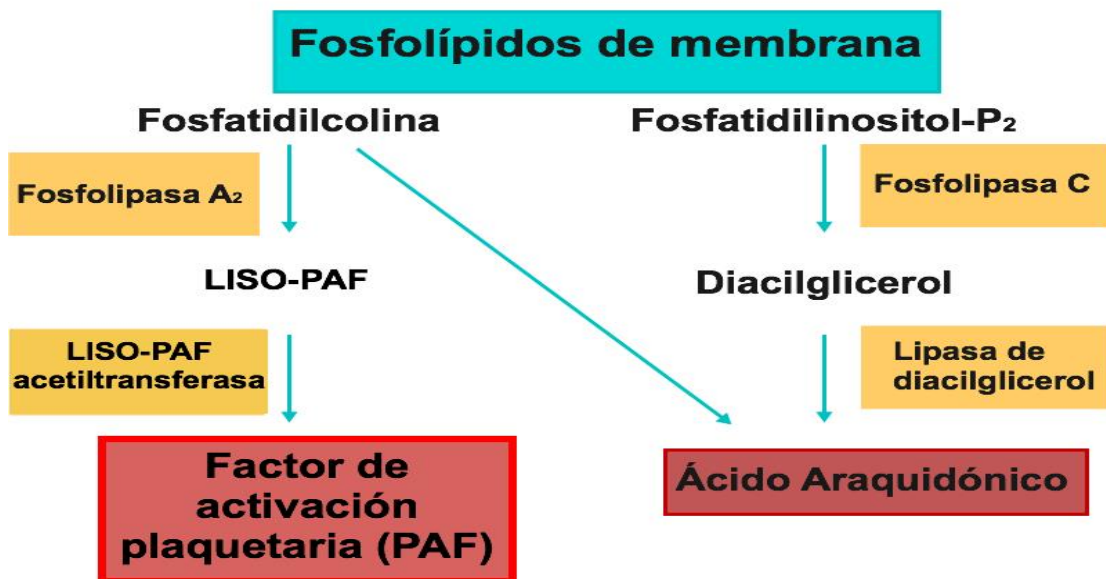


Figura 13. Mediadores derivados de las células. El factor de activación plaquetaria (PAF) deriva de glicerofosfolípidos membranosos que contienen colina. El ácido araquidónico deriva de fosfatos de fosfatidilinositol y de la fosfatidilcolina. Modificado de Murphy (2012).

2) Gránulos citoplasmáticos preformados y almacenados

Las dos aminas vasoactivas, histamina y serotonina, se almacenan como moléculas preformadas en las células cebadas y otra células y se encuentran entre los primeros mediadores que se liberan en las reacciones inflamatoria agudas. La

histamina causa dilatación arteriolar y es el principal mediador de la fase inmediata del aumento de la permeabilidad vascular, induciendo una contracción endotelial venular y espacios interendoteliales. La serotonina (5-hidroxitriptamina) es también un mediador preformado, se encuentra en el interior de los gránulos de cuerpos densos plaquetarios y es liberada durante la agregación plaquetaria (Murphy, 2012).

3) Derivados de la producción alterada de reguladores normales de la función vascular

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son sintetizadas por la vía de la NADPH oxidasa (fagocito oxidasa) y son liberadas por neutrófilos y macrófagos. Cuando se producen las ROS en el interior de los fagolisosomas, destruyen los microbios fagocitados y las células necróticas. Cuando se secretan en niveles bajos, pueden aumentar la expresión de quimiocinas, citocinas y moléculas de adhesión, amplificando así a cascada de los mediadores inflamatorios (Murphy, 2012).

Óxido nítrico. El NO es un gas radical libre, los macrófagos lo utilizan como metabolito citotóxico para destruir microbios y células tumorales. Cuando es producido por las células endoteliales, causa relajación del músculo liso y vasodilatación (Murphy, 2012).

Neurocininas. La familia de péptidos de las neurocininas incluye la sustancia P (SP) y las neurocininas A (NCA) y B (NCB). Estos péptidos guardan relación con la extravasación de las proteínas plasmáticas y el edema, la vasodilatación, la contracción y relajación del músculo liso, la secreción salival, la contracción de las vías aéreas y la transmisión de respuestas nocirreceptivas (Murphy, 2012).

I.3.2.2 Mediadores derivados de las proteínas plasmáticas

El plasma contiene los elementos de tres cascadas enzimáticas principales, estos sistemas interrelacionados incluyen 1) la cascada de coagulación, 2) la generación de cininas, y 3) el sistema del complemento (Murphy, 2012).

1) La cascada de coagulación

El factor Hageman activado (factor XIIa) inicia cuatro sistemas implicados en la respuesta inflamatoria: 1) el sistema de las cininas; 2) el sistema de la coagulación; 3) el sistema fibrinolítico, y 4) el sistema del complemento (Figura 14).

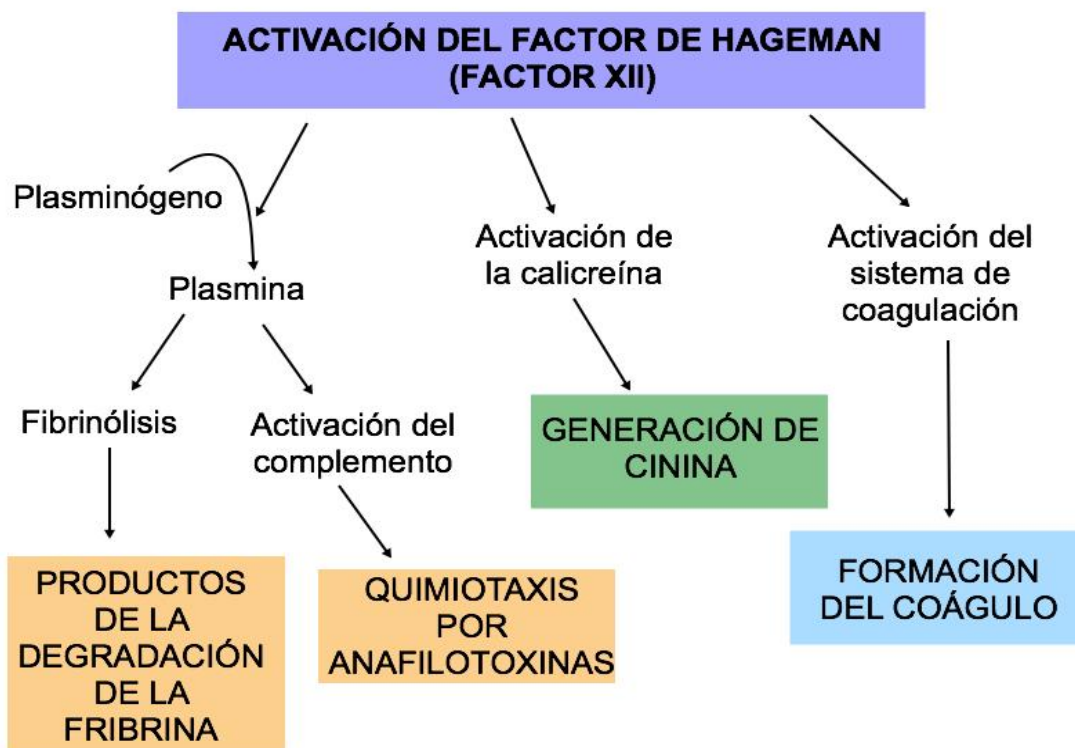


Figura 14. Activación del factor de Hageman y producción de mediador inflamatorio. La activación del factor de Hageman es un hecho clave que lleva a la conversión de plasminógeno a plasmina, lo que deriva en la generación de productos de la catálisis de fibrina y activa productos del complemento. La activación de la calicreína produce cininas y la activación del sistema de coagulación desemboca en la formación del coágulo. Modificado de Murphy (2012).

El factor Hageman (factor XII de la cascada de regulación intrínseca) es una proteína sintetizada por el hígado que circula en forma inactiva hasta que se encuentra con el colágeno, membrana basal o plaquetas activadas. Con la asistencia de un cofactor cininógeno, el factor XII sufre un cambio en su conformación (factor XIIa). En el sistema de coagulación, la cascada proteolítica accionada por el factor XIIa lleva a la activación de la trombina, que a continuación

cataliza al fibrinógeno soluble circulante para generar un coágulo de fibrina insoluble. El factor Xa, un metabolito intermedio en la cascada de coagulación, causa aumento en la permeabilidad vascular y migración leucocitaria. La trombina participa en la inflamación uniéndose a receptores activados por proteasas. La unión de la trombina a estos receptores de las células endoteliales lleva a su activación y a una mayor adhesión leucocitaria. Además la trombina genera fibrinopéptidos durante la degradación del fibrinógeno que aumentan la permeabilidad vascular y son quimiotácticos para los neutrófilos (Murphy, 2012) (Figura 15).

Las tres vías que forman la cascada de coagulación clásica

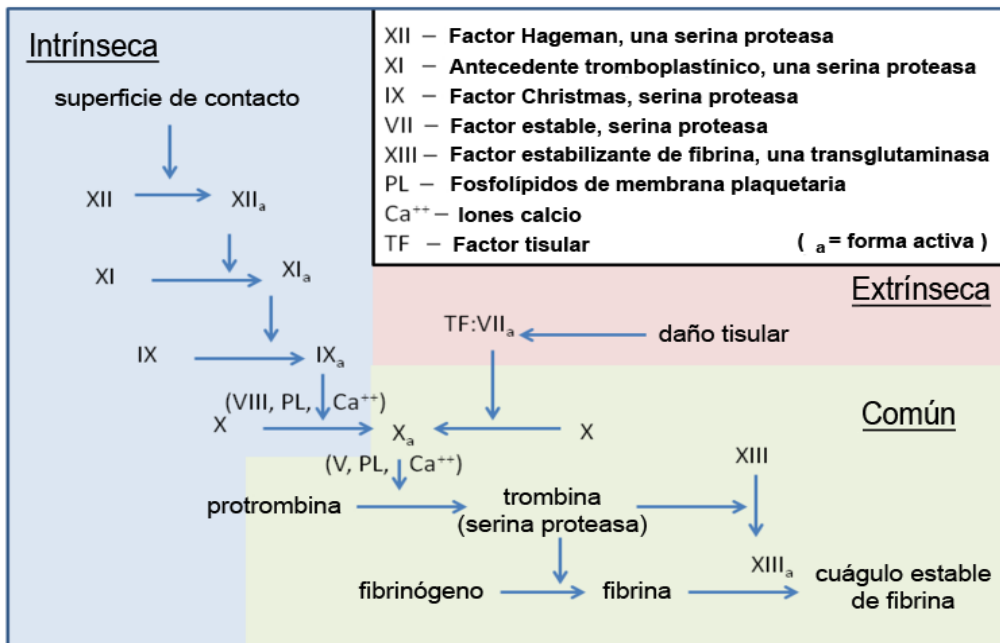


Figura 15. Cascada de coagulación. Tomado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Coagulación>.

Al tiempo que el factor de Hageman activado está induciendo la coagulación, activa el sistema fibrinolítico. Este mecanismo existe para limitar la coagulación al degradar la fibrina, solubilizando el coágulo de fibrina. El activador del plasminógeno y la calicreína degradan el plasminógeno, proteína plasmática encerrada en el coágulo de fibrina. El producto resultante, la plasmina, es una proteasa que degrada la fibrina y es, por ende, importante en la lisis de los

coágulos. La plasmina a su vez degrada la proteína del complemento C3, lo que da lugar a la producción de C3a. La plasmina puede también activar el factor de Hageman, amplificando de este modo la respuesta (Figura 16).

2) La generación de cininas

Las cininas son agentes inflamatorios potentes que se forma en el plasma por acción de las calicreínas proteasas. La bradiginina y los péptidos relacionados regulan múltiples procesos biológicos como la presión sanguínea, la contracción y relajación del músculo liso, la extravasación del plasma, la migración celular, la activación de células inflamatoria y las respuestas al dolor de origen inflamatorio. Quizá la función más significativa de las cininas es su capacidad de amplificar las respuestas inflamatorias al estimular las células de los tejidos locales y las células inflamatorias para que generen mediadores adicionales como los prostanoïdes, las citocinas (en especial el factor de necrosis tumoral alfa TNF- α y las interleucinas), el óxido nítrico y las taquicininas (Kumar *et al.*, 2008) (Figura 16).

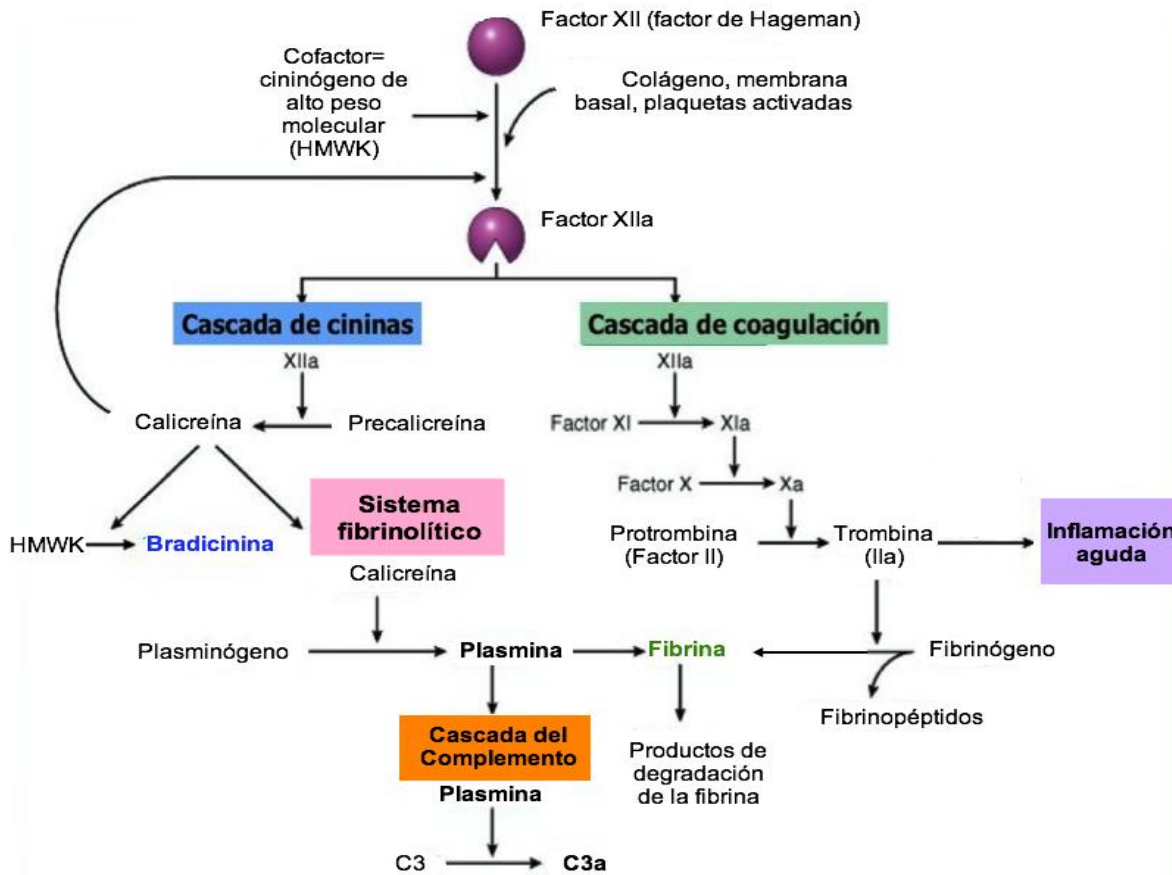


Figura 16. Interrelaciones entre los cuatro sistemas mediadores derivados del plasma desencadenados por la activación del factor XII (factor Hageman). Modificado de Kumar et al. (2008).

3) El sistema del complemento

Consta de proteínas plasmáticas que desempeñan una importante función en la defensa del huésped (inmunidad) y en la inflamación (Murphy, 2012). El sistema del complemento consiste en más de 30 proteínas entre las que se incluyen enzimas plasmáticas, proteínas reguladoras y proteínas que lisan células (Kumar *et al.*, 2008).

Los factores derivados del complemento que se producen a lo largo de la vía afectan a una variedad de fenómenos en la inflamación aguda:

Efectos vasculares. C3a y C5a aumentan la permeabilidad vascular y causan vasodilatación al inducir la liberación de histamina de las células cebadas. Estos

productos se denominan también anafilotoxinas. C5a activa también la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico en los neutrófilos y macrófagos, causando liberación de mediadores más inflamatorios.

Activación, adhesión y quimiotaxis de los leucocitos. C5a activa los leucocitos, aumentando la adhesión al endotelio y es un potente agente quimiotáctico.

Fagocitosis. Cuando se fijan a una superficie microbiana, C3b y su producto proteolítico inactivo iC3b actúan como opsoninas (Murphy, 2012).

I.3.3 La mionecrosis

Los envenenamientos por especies viperinas inducen predominantemente miotoxicidad local, caracterizada por la presencia de mionecrosis en la zona anatómica donde el veneno fue inyectado. La mionecrosis local es comúnmente asociada con otros efectos, como la hemorragia, la formación de ampollas y el edema, en un complejo patrón de daño tisular local (Milani *et al.*, 1997; Otero, *et al.*, 2007).

I.3.3.1 Morfología del músculo esquelético

El músculo está compuesto de células musculares rodeadas de vainas de tejido conectivo por las cuales pasan vasos sanguíneos y nervios. La capa externa, el epimisio, rodea al músculo entero y se continúa con el tejido conectivo de la fascia. El perimisio es un tejido conectivo delgado que rodea los paquetes de células musculares (fascículos).

Inmediatamente rodeando grupos individuales de células musculares se encuentra el endomisio, el cual contiene capilares, los vasos sanguíneos más delgados (Mebs & Ownby, 1990) (Figura 17).

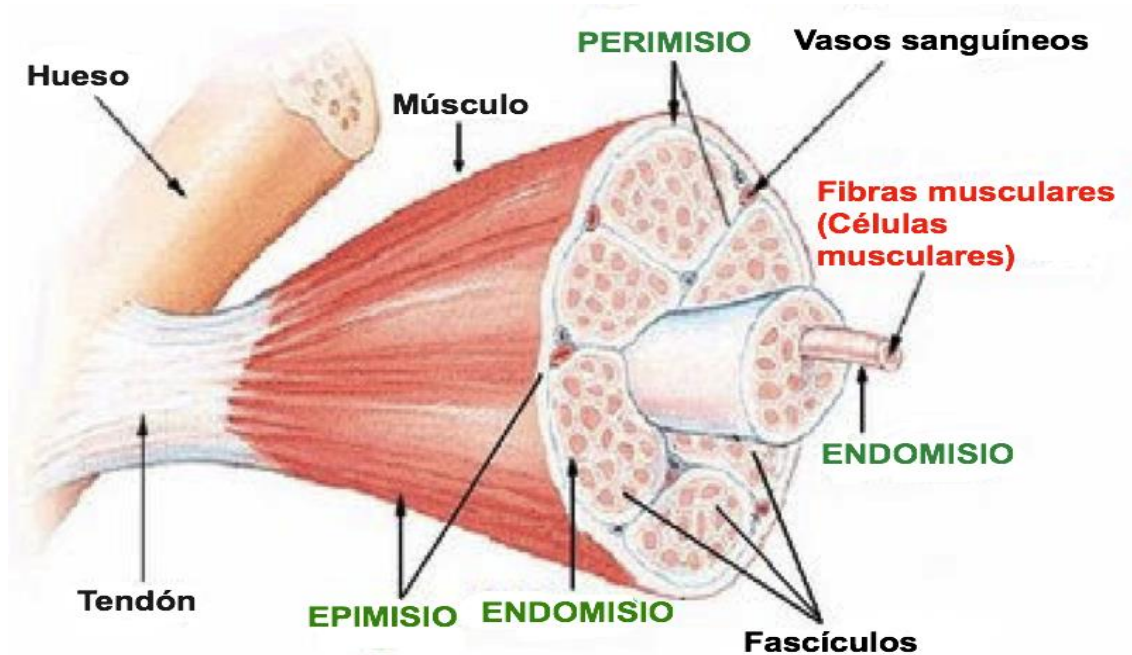


Figura 17. Revestimientos del músculo esquelético. Tomado de <http://www.inatacion.com/articulos/fisiologia/musculos.html>.

Las células musculares esqueléticas son elongadas, ligeramente cónicas en sus terminaciones. La membrana celular, es llamada sarcolema, y al citoplasma se le conoce como sarcoplasma. Estas células tienen muchos núcleos, los cuales se localizan en la periferia justo debajo de la membrana celular (Mebs & Ownby, 1990).

El sarcoplasma contiene los organelos y aparte contiene miofilamentos que están agrupados en paquetes llamados miofibrillas.

Las mitocondrias se conocen como sarcosomas, son numerosas y se encuentran en grupos cerca de los polos del núcleo, debajo de la membrana celular e intercaladas entre las miofibrillas.

Un aparato de Golgi pequeño e inactivo se localiza cerca de los núcleos, el glucógeno es abundante entre las miofibrillas, y gotas de lípidos se localizan cerca de las mitocondrias grandes (Mebs & Ownby, 1990).

El patrón estriado de las células músculo esqueléticas se debe a la estructura organizada de los miofilamentos en miofibrillas. Cada miofibrilla está compuesta de numerosos miofilamentos arreglados en registro, lo que le da el distintivo patrón transversal. Las bandas oscuras A separan a las bandas claras I, cada banda A tiene una zona central clara llamada banda H mientras que cada banda I está dividida en dos partes por una línea densa conocida como banda Z.

La región entre dos bandas Z se llama sarcómero (S) y es considerada la unidad estructural y funcional de la contracción. El sarcómero se repite a lo largo de la miofibrilla (Mebs & Ownby, 1990).

Hay dos tipo de miofilamentos, los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina. Los filamentos de actina están anclados a la banda Z y son el mayor componente de la banda I y se extienden entre los filamentos de miosina a lo largo de la banda A (Figura 18).

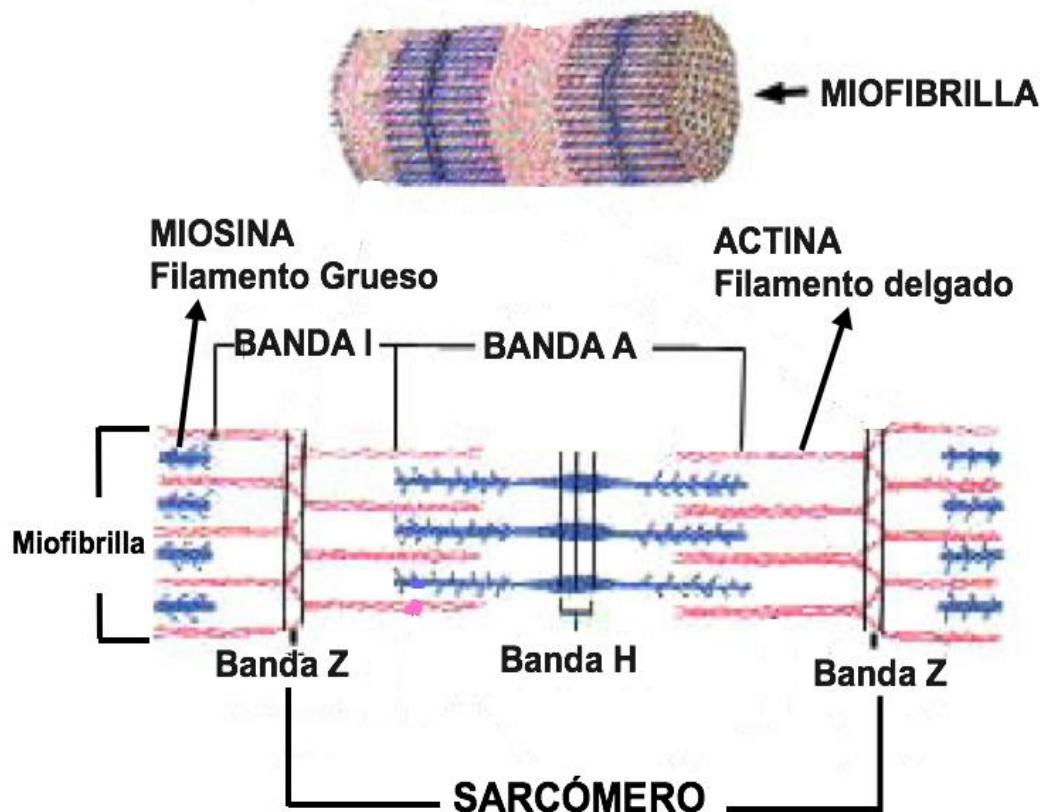


Figura 18. Composición de las miofibrillas. Modificado de <http://www.facmed.unam.mx/LibroNeuroFisio/10Sistema%20Motor/10aMovimiento/Textos/MuscAnatomia.html>.

Dos proteínas reguladoras, troponina y tropomiosina, están asociadas a los filamentos de actina. La regulación de la contracción por estas proteínas se basa en las concentraciones de calcio en el sarcoplasma. Cuando los niveles de calcio se encuentran bajos, la tropomiosina se localiza en la periferia a lo largo del filamento de actina y bloquea a los monómeros G de actina para que no puedan interactuar con la miosina. Cuando los niveles de calcio son suficientemente altos, el calcio se une a la troponina, lo que causa que la molécula de tropomiosina se desplace y que los sitios G de actina se desbloqueen, facilitando que el filamento de actina tenga contacto con las cabezas de miosina (Mebis & Ownby, 1990).

En las células músculo esqueléticas los elementos del retículo sarcoplásmico están altamente organizados y especializados. Las membranas del retículo sarcoplásmico forman una extensa red de cisternas y túbulos alrededor de las miofibrillas. Asociados con un sistema membranaral transverso llamados túbulos T originados en la superficie de la célula como una extensión de la membrana celular hacia adentro de la célula. El arreglo de estas membranas es crítico para la conducción de la señal excitatoria desde el exterior de la célula muscular hacia el interior cuando la contracción ocurre (Figura 19) (Mebs & Ownby, 1990).

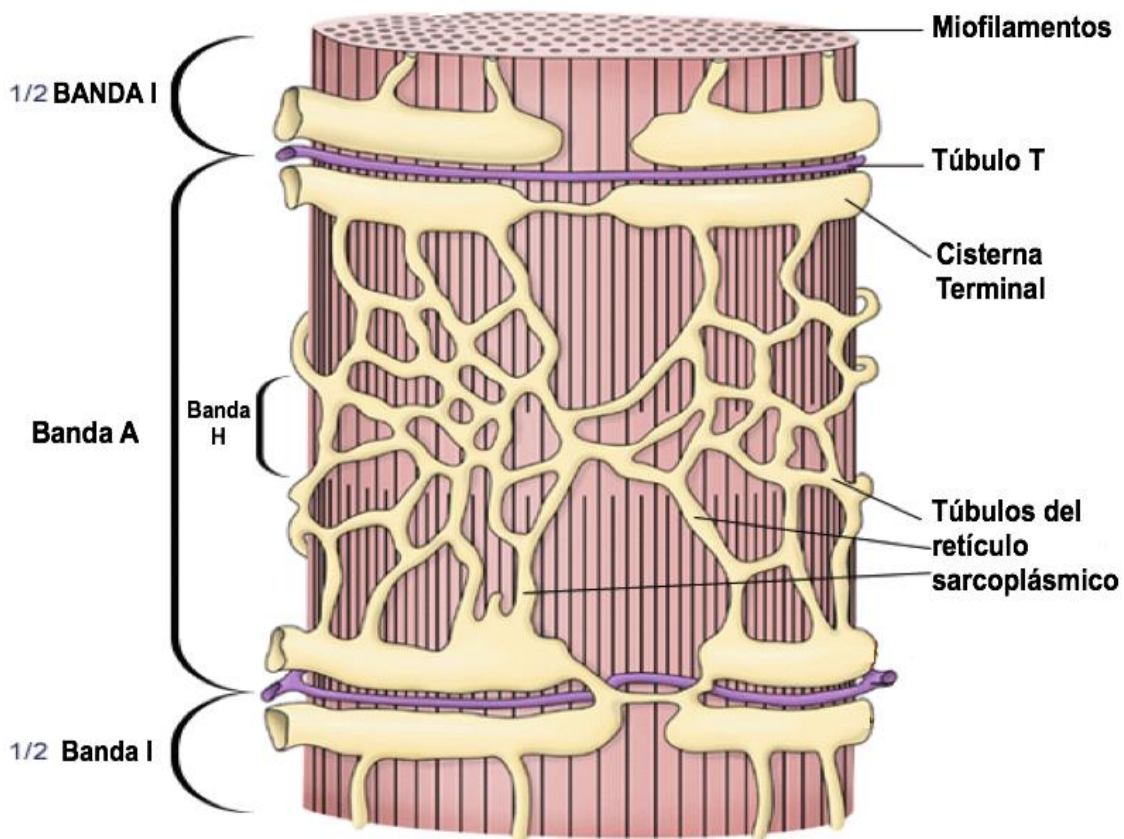


Figura 19. Retículo sarcoplásmico con sus túbulos y cisternas. Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/Libro-NeuroFisio/10-Sistema%20Motor/10a-Movimiento/Textos/MuscAnatomia.html>.

I.3.4 El dolor

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (ISAP por sus siglas en inglés) el dolor se ha definido como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en términos de ese daño” (Bilbeny & Paelle, 2005). La función fisiológica del dolor es alertar al cerebro de una irregularidad en la homeostasis proveyendo información acerca del estímulo que está causando la lesión, permitiendo al cuerpo protegerse de un daño mayor. La nocicepción se origina en fibras sensoriales periféricas mediante la estimulación de nociceptores que transmiten información acerca del estímulo nocivo (McMahon *et al.*, 2005).

En función de los mecanismos fisiopatológicos, el dolor puede diferenciarse en nociceptivo, neuropático o inflamatorio (Figura 20).

El **dolor nociceptivo** es la consecuencia de una lesión somática, el estímulo es potencialmente dañino para la integridad física, los nociceptores estimulados se localizan en piel, músculo o articulaciones (Marhuenda, 2005).

El **dolor neuropático** es el resultado de una lesión y alteración de la transmisión de la información nociceptiva a nivel del sistema nervioso central o periférico; una de sus características es la aparición de **alodinia**, que es el dolor frente a estímulos que habitualmente no son dolorosos debido a una reducción del umbral del dolor (Otermin, 2003).

El **dolor inflamatorio** se transmite por nervios normales y vías como las del dolor nociceptivo. Sin embargo, el grado de daño tisular conduce a la activación de mediadores inflamatorios agudos y crónicos que potencian el dolor, disminuyen los umbrales de conducción y sensibilizan el sistema nervioso central al estímulo entrante.

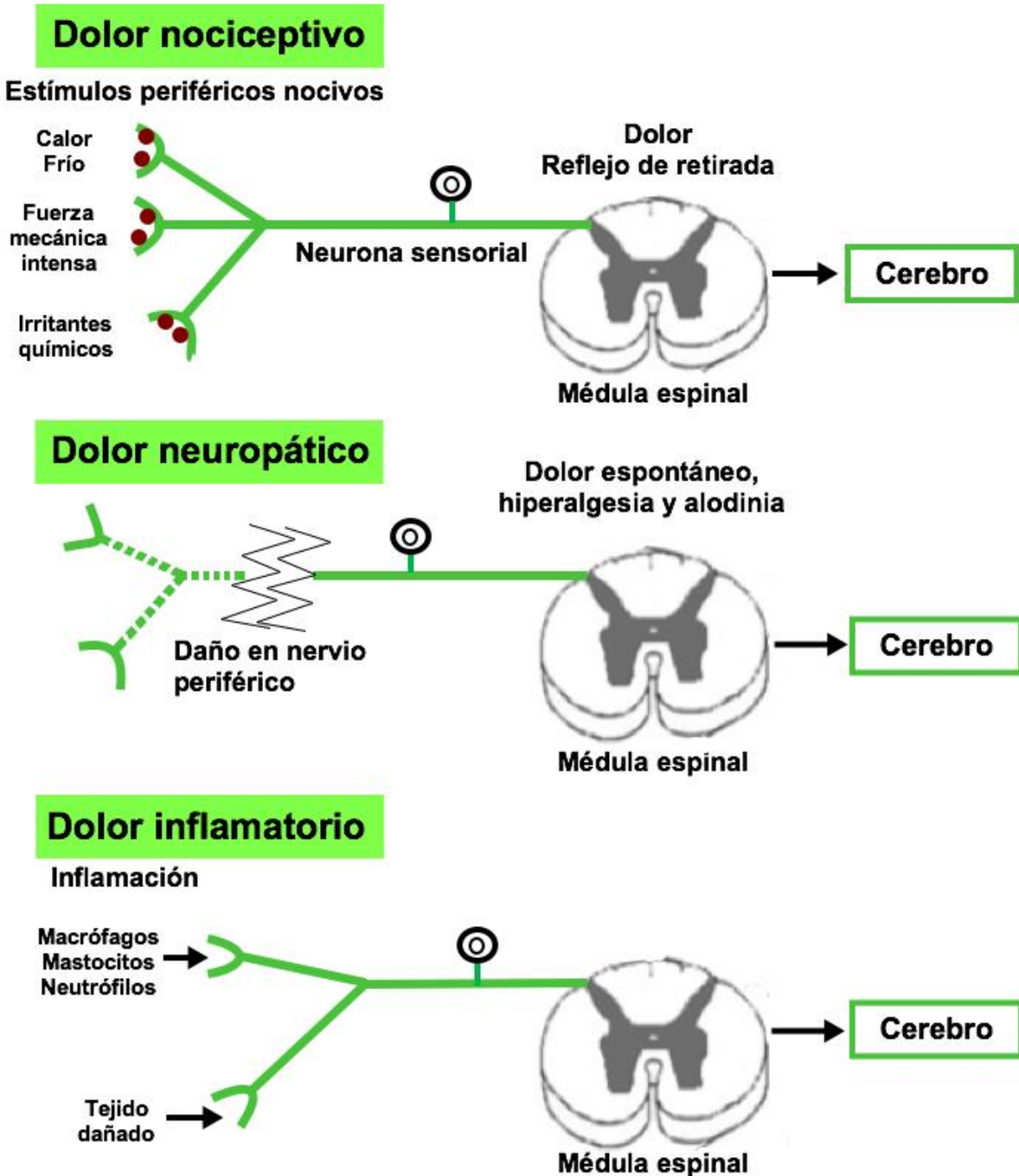


Figura 20. Tres principales tipos de dolor, según su mecanismo fisiopatológico. Modificado de Woolf (2004).

Durante la inflamación, se observa un incremento significativo de la expresión de canales iónicos, así como de la excitabilidad de las membranas de las neuronas

periféricas (Devor, 1994; Matzner & Devor, 1994; Waxman *et al.*, 1994). Las vías periféricas del dolor son activadas por una variedad amplia de estímulos incluyendo mediadores químicos inflamatorios que están implicados en la génesis, persistencia y severidad del dolor. Los mediadores involucrados en el dolor incluyen iones (K^+ , H^+), ATP, óxido nítrico (NO), adenosina, serotonina (5-HT), histamina, bradicinina, citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 y IL-8), neurotrofina, factor de crecimiento nervioso (NGF), neuropéptidos (substancia P-SP, neurocinina A-NKA, péptido relacionado con el gen de la calcitonina CGRP), eicosanoides, y mediadores simpáticos, operando de manera sinérgica actuando en las fibras sensoriales por dos vías distintas: a) provocando dolor vía activación directa de nociceptores y b) sensibilizando neuronas aferentes primarias reduciendo su umbral (**alodinia**) de manera tal que tengan una respuesta exaltada al estímulo nocivo (**hiperalgesia**) (Dray, 1997; Kidd & Urban, 2001; Riedel & Neeck, 2001) (Figura 21).

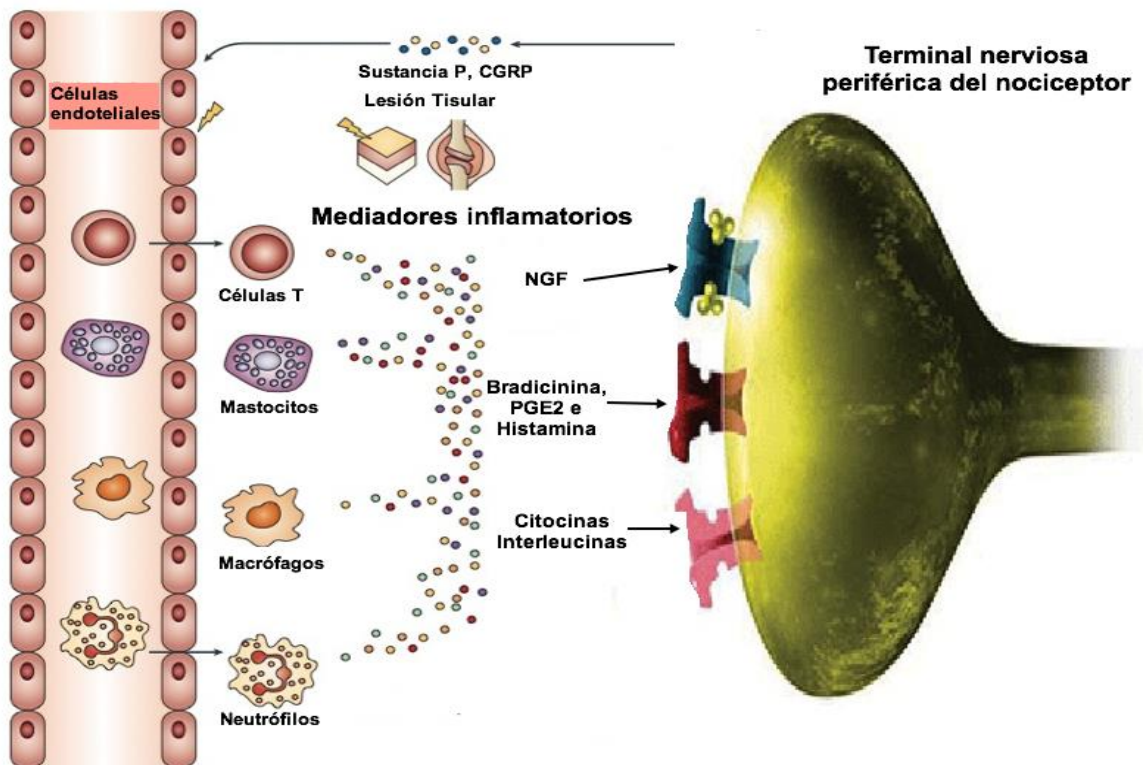


Figura 21. Dolor inflamatorio. Modificado de Ru-Rong *et al.* (2014).

El asta dorsal de la médula espinal es un sitio importante pues es el encargado de integrar y modular el estímulo que viaja desde la periferia hasta el sistema nervioso central (Kidd & Urban, 2001; Riedel & Neeck, 2001). El neurotransmisor implicado en procesar la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal es el glutamato (Schaible & Richter, 2004). Durante la inflamación, el ingreso de las fibras C resulta en la expresión de un segundo receptor de glutamato, el receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (Dickenson & Sullivan, 1987). La activación del receptor NMDA lleva a un incremento en la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal, contribuyendo a una progresiva excitabilidad durante el curso del estímulo y a una sensibilización central (Woolf, 1983; Woolf & Wall, 1986). Las prostaglandinas y el óxido nítrico (NO) se generan en el asta dorsal de la médula espinal facilitando la excitabilidad de las neuronas espinales (Besson, 1999).

Adicionalmente, las células gliales (astrocitos y microglia) han sido implicadas en los estados exagerados de dolor debido a la liberación de varias sustancias neuroactivas (Wieseler-Frank *et al.*, 2004). La activación de las células gliales conduce a la liberación de una variedad de sustancias neuroactivas, incluyendo citocinas pro-inflamatorias, factor de crecimiento nervioso (NGF), prostaglandinas, NO y amino ácidos excitatorios. Estas sustancias estimulan directamente la transmisión dolorosa, así como la liberación acelerada de neurotransmisores desde las neuronas aferentes primarias, contribuyendo a la hiperexcitación central y periférica (Holguin *et al.*, 2002).

I.4 El veneno y su papel en la inflamación

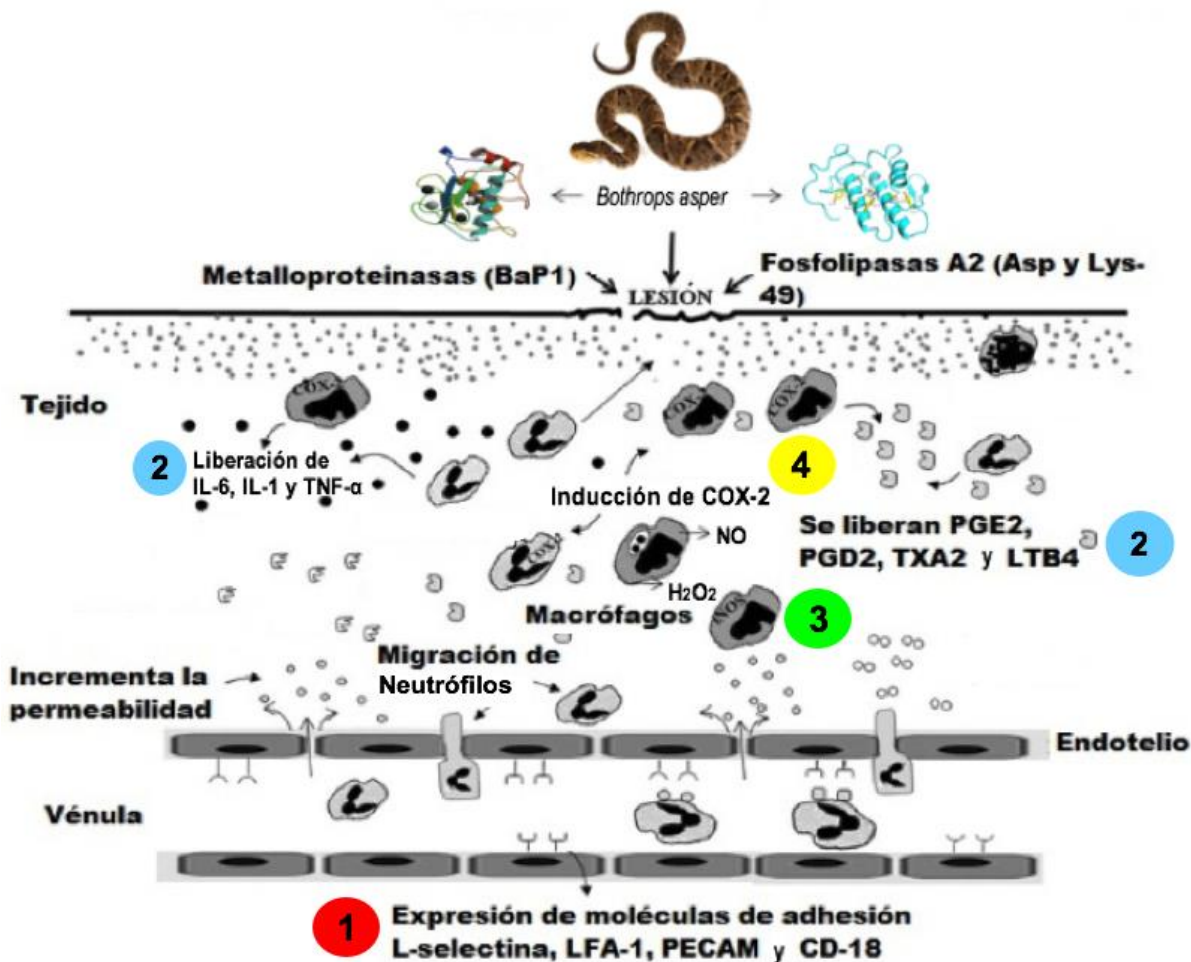


Figura 22. Representación esquemática del posible mecanismo de acción de las fosfolipasas A₂ y metaloproteinasas del veneno de *Bothrops asper* sobre los eventos locales de la reacción inflamatoria. Modificado de Teixeira (2009).

La capacidad del veneno de *Bothrops asper* para generar inflamación fue reportado por primera vez en el trabajo realizado por Gutiérrez *et al.* (1980) donde la inyección de veneno en la región plantar de ratón causó edema en los primeros intervalos de tiempo manteniéndose hasta las 24 horas. Los componentes del veneno de *Bothrops asper* juegan un papel muy importante en la inflamación: 1) Estimula la expresión de moléculas de adhesión (LFA-1, L-selectina, MAIC-1, PECAM-1 y CD-18) en los neutrófilos y las paredes endoteliales (Zamuner *et al.*, 2005). 2) Citocinas y eicosanoides son liberados a partir de la inyección del veneno (Teixeira, 2009). 3)

El veneno incrementa la fagocitosis y desencadena las funciones antimicrobianas de los macrófagos con un consecuente incremento de la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico por los macrófagos, lo cual genera peroxinitritos tóxicos potenciando el daño tisular (Zamuner *et al.*, 2001). 4) La fosfolipasa A₂ induce la síntesis de prostaglandinas y tromboxano catalizando la hidrólisis de ácidos grasos en la posición sn-2 de los fosfolípidos presentes en la membrana celular (Moreira *et al.*, 2008) (Figura 22).

I.4.1 El veneno y su papel en la mionecrosis

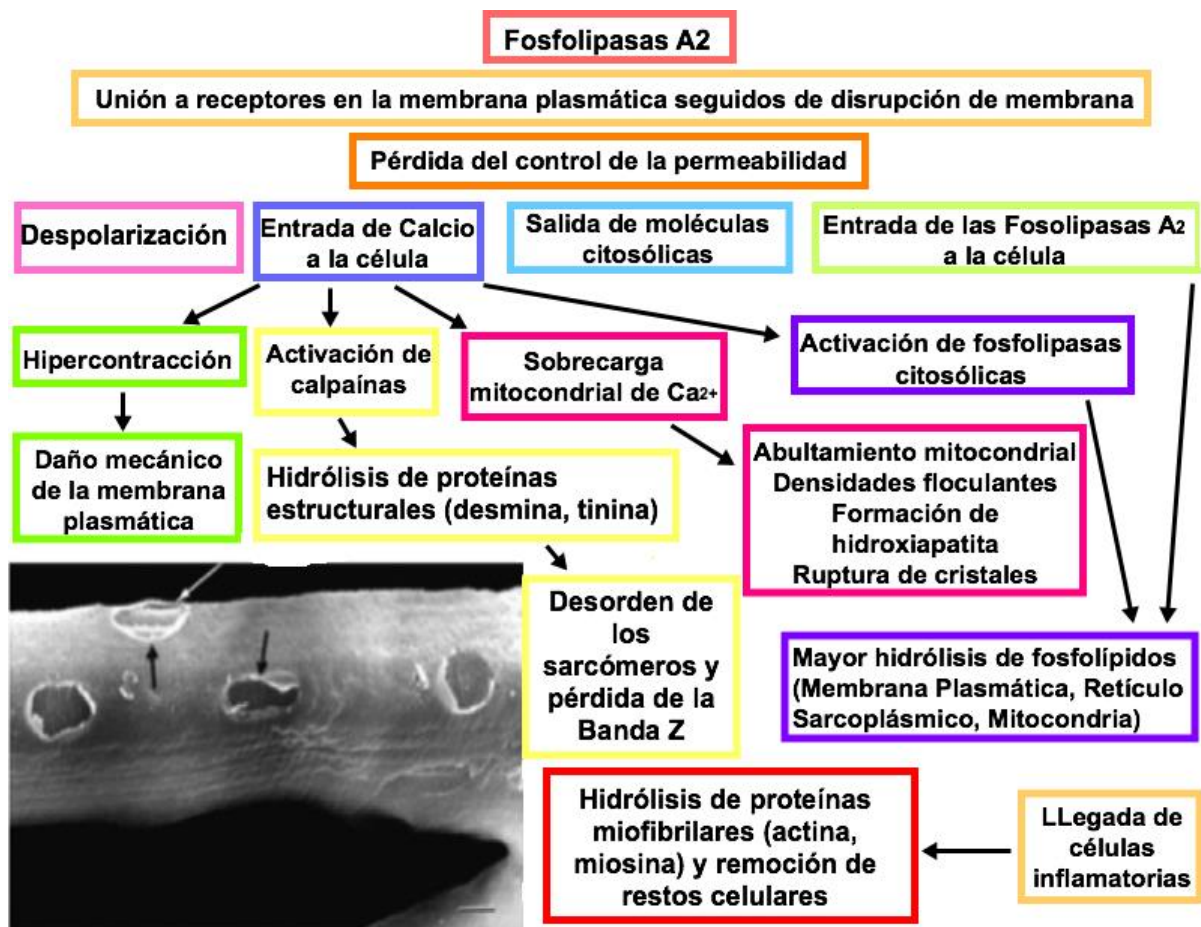


Figura 23. Secuencia de eventos degenerativos celulares en músculo esquelético por acción de las fosfolipasas A₂ presentes en el veneno de *Bothrops asper*. Tomado y Modificado de Gutiérrez & Ownby (2003).

La drástica y rápida perturbación de la membrana plasmática inducida por las fosfolipasas A₂ del veneno de *Bothrops asper* promueve el ingreso de calcio desde la zona extracelular hacia el citosol, elevando rápidamente la concentración citosólica de este catión, así como la salida de marcadores citoplasmáticos, como las enzimas deshidrogenasa láctica (DHL) y creatinquinasa (CK). Probablemente, el ingreso de calcio es la consecuencia más relevante de la disrupción membranal, siendo responsable de una variedad de mecanismos lesivos como son: alteraciones del citoesqueleto (hipercontracción de miofilamentos, resultando en la formación de masas amorfas de miofibrillas y de espacios citoplásmicos carentes de miofilamentos) fenómeno que provoca a la larga daño mecánico en la membrana (Dixon & Harris, 1996), daño mitocondrial (abultamiento de la mitocondria, formación de densidades floculantes, formación de espacios con densos cristales y ruptura de la membrana mitocondrial), degradación y consecuente pérdida de las proteínas desmina, proteína que se encuentra entre los filamentos del músculo esquelético, formando uniones entre las bandas Z y entre las miofibrillas y la membrana plasmática (Lazarides, 1980) y titina, proteína que regula la integridad estructural y la longitud de los sarcómeros durante los ciclos de contracción y relajación; lo que conlleva a la pérdida del registro en los sarcómeros, a la disgregación de las bandas A e I, y a la liberación de actina y miosina en el citosol (Harris *et al.*, 2003), activación de proteasas dependientes de calcio (Calpaínas), y la activación de fosfolipasas endógenas que ocasionan daño adicional (Gutiérrez & Lomonte, 1995); promoviendo la degradación de fosfolípidos de la membrana plasmática y las membranas de organelos intracelulares, como son mitocondrias, retículo sarcoplásmico y túbulos T (Montecucco *et al.*, 2008). Como consecuencia de estos procesos, las células se lesionan de forma irreversible en un proceso de muerte celular necrótica (Figura 23).

I.4.2 El veneno y su papel en la nocicepción

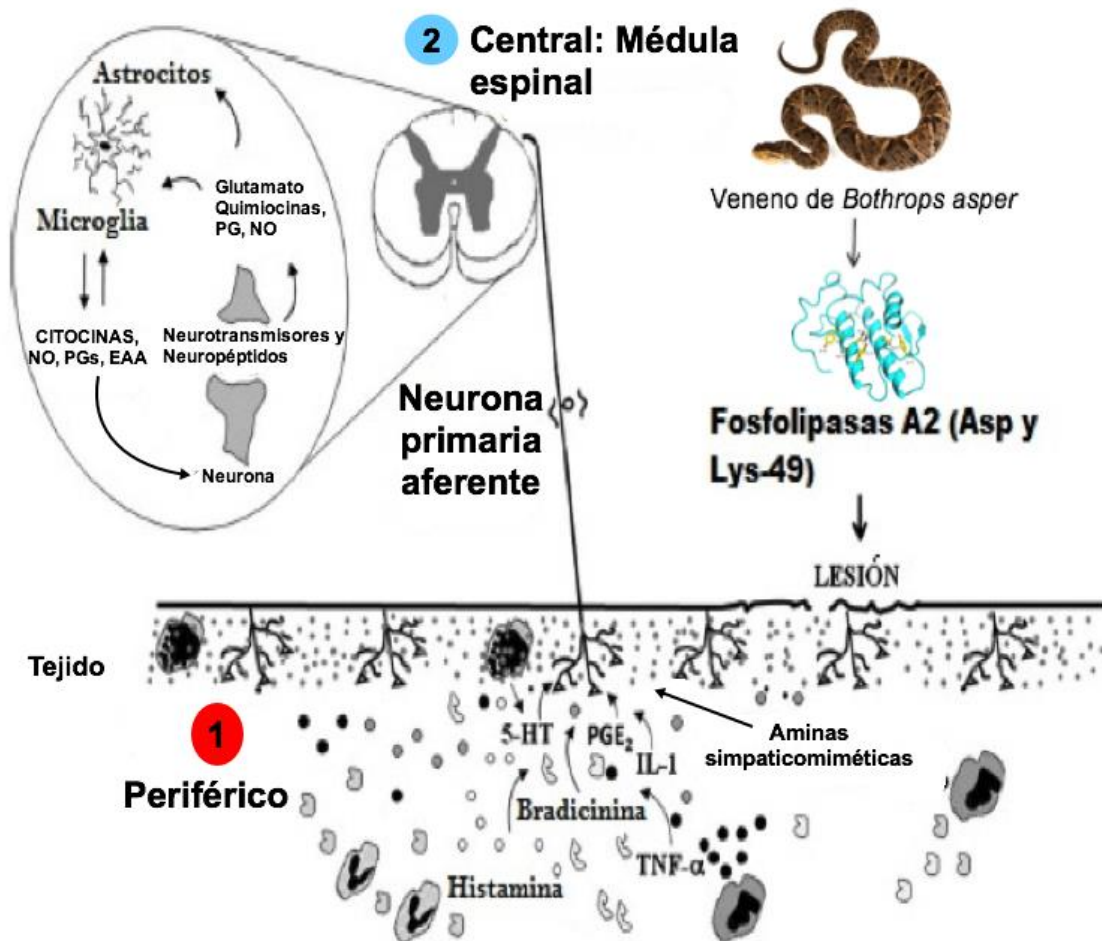


Figura 24. Representación esquemática del posible mecanismo del sistema nervioso central y periférico implicados en la hiperalgesia y alodinia inducido por las fosfolipasas A₂ del veneno de *Bothrops asper*. Modificado de Teixeira (2009).

La nocicepción (hiperalgesia y alodinia) desencadenada por las fosfolipasas A₂ (PLA₂) es un proceso generado parcialmente en la periferia y parcialmente en el sistema nervioso central (médula espinal) (Figura 24).

En la **periferia**: la inoculación de PLA₂ miotóxicas causa lesión tisular lo que resulta en la liberación y síntesis de mediadores químicos. Estos mediadores actúan en receptores específicos localizados en la membrana de neuronas aferentes primarias, generando señales nociceptivas que se conducen hacia el asta dorsal de la médula espinal. En la **médula espinal**, neurotransmisores y neuropéptidos son

liberados en la hendidura sináptica, activando a las neuronas de proyección. Existe activación de la microglía y astrocitos en el asta dorsal, una hora después si se inyecta la fosfolipasa A₂ con residuo Asp-49 la cual es catalíticamente activa (Chacur *et al.*, 2003; Chacur *et al.*, 2004; Watkins *et al.*, 2006) (Figura 24).

I.5 Tratamiento contra la mordedura de serpiente

Los primeros auxilios en el caso de presentarse estos accidentes deben limitarse a la inmovilización de la extremidad afectada y al rápido traslado del paciente al hospital. Torniquetes, métodos de succión del veneno, incisiones individuales o múltiples alrededor de la herida incrementan el riesgo de isquemia y necrosis, así como el riesgo de contraer una infección (Busch *et al.*, 2000; Hardy, 2003). Los pacientes que presentan cuadros severos de envenenamiento son preferiblemente tratados en una unidad de cuidados intensivos. Aquellos pacientes con envenenamiento moderado pueden ser tratados en la sala de emergencias durante las primeras 24 horas (Otero, 2007). Hasta la fecha, el único tratamiento científicamente validado para este tipo de envenenamiento es aplicar un antivenenos (faboterápico antiviperino).

I.6 Antivenenos (faboterápico antiviperino)

Los antivenenos son inmunoglobulina IgG producidas por el fraccionamiento de plasma usualmente obtenido de animales domésticos de gran tamaño que fueron hiper-inmunizados contra el veneno de serpientes relevantes (OMS, 2010). La acción de los antivenenos se basa en la formación del complejo antígeno-anticuerpo; para que el veneno ejerza su efecto tóxico necesita llegar al órgano blanco, una vez ahí debe acoplarse al receptor o sustrato específico donde ejerce su efecto tóxico. El faboterápico impide que el sitio activo del veneno interactúe con su receptor y, por lo tanto impide que se desencadenen los mecanismos fisiopatológicos de la intoxicación (OMS, 2010). La IgG está formada por dos regiones o fracciones: la fracción Fab (fragmento de unión al antígeno) y la fracción

Fc (fragmento cristalizable o constante); dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro constituyen el denominado fragmento F(ab')₂ (OMS, 2010) (Figura 25).

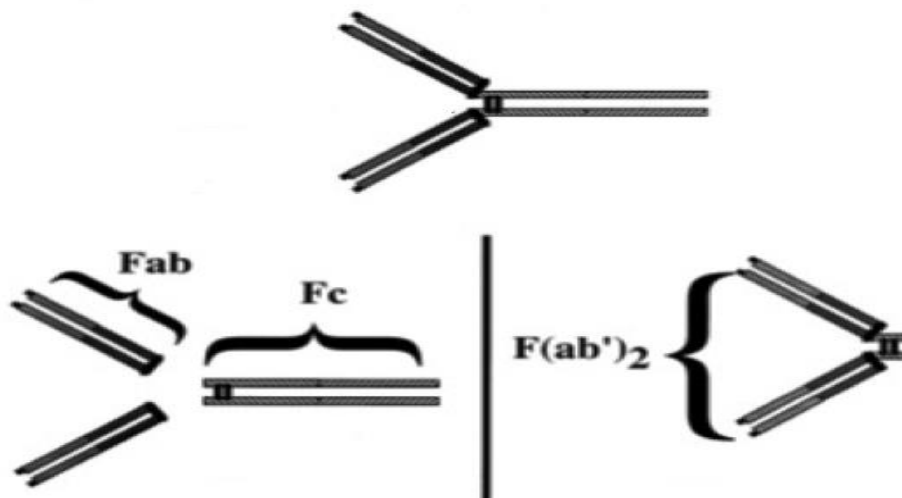


Figura 25. Inmunoglobulina y sus dos fracciones (Fab y Fc). Modificado de OMS (2010).

No obstante, la efectividad de los antivenenos es limitada para proteger los daños tisulares consecuentes, a su vez, debido a las características fisicoquímicas del antiveneno se generan en la mayoría de los casos reacciones adversas que van desde fiebre y escalofríos hasta hipotensión, paro cardíaco y broncoespasmos (Otero-Patiño *et al.*, 1998; Otero, 2007); además estudios experimentales registran una mínima neutralización por parte del antiveneno aun siendo pre-incubado con el veneno antes de la inyección en modelos animales (Gutiérrez *et al.*, 1981); otra polémica radica en la accesibilidad limitada de los antivenenos en las áreas rurales donde la mayoría de los accidentes ocurren aumentando las posibilidades de mortalidad (Chippaux & Goyon, 1991). En algunas ocasiones existe baja especificidad del faboterápico hacia el veneno debido a la diversidad molecular presente en los venenos de serpientes. Por todos estos aspectos es que en los lugares donde ocurren los accidentes ofídicos, numerosas plantas son usadas como alternativas terapéuticas para su tratamiento (Gomes *et al.*, 2010).

II. ANTECEDENTES

II.1 Antecedentes empíricos

En Bangladesh, los curanderos utilizan plantas como *Allium cepa* L., *Aristolochia indica* L., *Emblica officinalis* Gaertn. y *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br como tratamiento para los accidentes ofídicos (Kadir *et al.*, 2015). En la República de Kenia, las hojas de plantas como *Bidens pilosa* L., *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray y *Microglossa pyrifolia* (Lam.) Kuntze son usadas como tratamiento para los accidentes ofídicos (Owuor *et al.*, 2005).

En nuestro país, Algunas de las plantas utilizadas por curanderos de Veracruz para tratar los accidentes ofídicos son *Hibiscus tiliaceus* (Mata de la víbora) utilizada en la localidad El Serrano, de la cual las semillas son preparadas en extracto alcohólico, *Aristolochia ovalifolia* (Guaco negro, canastilla) utilizada en la localidad de Sayula, de la cual se pulveriza la raíz, y *Piper amalago* (Gorgoncillo) utilizada en la localidad de Sayula, de la cual se utiliza la raíz (Ramos-Hernández *et al.*, 2007).

II.1.1 El género *Erythrina* contra el accidente ofídico

El género *Erythrina* constituye una fuente importante de especies, utilizadas por la medicina tradicional de los pueblos de diversas regiones del mundo (Pino-Rodríguez *et al.* 2004); el género ha sido estudiado desde diferentes perspectivas en varias partes del continente americano, ya sea su efecto antiinflamatorio (Vasconcelos *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Saidu *et al.*, 2000; Miño *et al.*, 2002), su efecto antinociceptivo (Miño *et al.*, 2002; Oliveira, *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2003; Marchioro *et al.*, 2005) o su efecto analgésico (Saidu *et al.*, 2000).

En la República de Kenia, en la etnia de Luo los curanderos utilizan la savia de la corteza de *Erythrina excelsa* Baker como un antídoto para los accidentes ofídicos (Owuor *et al.*, 2005). En Bangladesh, en los distritos de Chittagong, Rangamati, Bandarban y Khagrachari los curanderos utilizan una mezcla de los estambres y la corteza de raíz de *Erythrina variegata* en forma de pasta; esta pasta se aplica internamente y externamente para reducir la inflamación y el dolor por la mordida de serpiente (Kadir *et al.*, 2015).

II.1.2 *Erythrina americana* contra el accidente ofídico

En Acayucan, Veracruz los curanderos utilizan *Erythrina americana* Mill. (árbol de la víbora) preparada en infusiones o directamente mordiendo las hojas del árbol para tratar dicho padecimiento (Ramos-Hernández *et al.*, 2007). En Catemaco, los curanderos utilizan el conocimiento, el machacado y el extracto alcohólico; además, también aplican algunas plantas frescas, como es el caso de *Erythrina americana*, de la cual se comen las hojas para contrarrestar el veneno de serpientes (Garrido, 1997).

En el mismo estado de Veracruz pero en los Tuxtlas, se utiliza una infusión de *Erythrina* sp. para tratar la mordedura de Nauyaca (*Bothrops asper*) que habita en dicha región (comunicación personal).

II.2 Antecedentes experimentales

Se han realizado una serie de trabajos a nivel mundial con respecto a los efectos de distintas plantas en el tratamiento de los accidentes ofídicos. Borges *et al.* (2000) evaluó el efecto del extracto acuoso de *Casearia sylvestris* en veneno de víbora y veneno de abeja: El extracto resultó ser eficaz para inhibir la actividad miotóxica de cuatro venenos de *Bothrops*; así como a las fosfolipasas purificadas del veneno (PLA₂ Lys-49 y Asp-49). En cuanto a la neutralización del edema, el extracto logró inhibir el veneno de *B. moojeni* así como su miotoxina II purificada.

Alam & Gomes (2003) evaluaron el efecto neutralizante de dos plantas hindús *Vitex negunda* y *Embllica officinalis* en el veneno de dos serpientes venenosas *Vipera russellii* y *Naja kaouthia*, los extractos de raíz de ambas plantas en una cantidad de 5 mg de extracto/ μ g de veneno por ratón redujeron el edema plantar. Los autores atribuyeron este hecho a los triterpenos y taninos, que se aislaron y purificaron en estudios anteriores, a partir de estas plantas.

Núñez *et al.* (2004) trabajaron con 12 extractos de plantas (*Bixa*, *Ficus*, *Struthanthus*, *Gonzalagunia*, *Brownea*, *Tabebuia*, *Pleopeltis*, *Trichomanes*,

Renealmia, *Heliconia*, *Dracontium*, *Citrus*) y su efecto neutralizador del edema causado por el veneno de *Bothrops asper*, encontrando que el efecto varió en función de la cantidad y ruta de administración, no obstante, la neutralización del edema no superó el 40% en todos los extractos, siendo la administración *in situ* la mejor para el extracto de *Citrus limon* (64%).

Meenatchisundaram *et al.* (2009) evaluaron la actividad de los extractos de raíz de *Mimosa pudica* contra los venenos de *Naja naja* y *Bangarus caeruleus*, como resultados obtuvieron una reducción del 30% del grosor del edema cuando la cantidad del extracto fue de 2.5 mg por mg de veneno, la reducción no fue dosis dependiente.

Mahadeswaraswamy *et al.* (2009) evaluaron con el extracto metanólico de las semillas de la uva (*Vitis vinifera*) para inhibir los efectos locales del veneno de *Daboia russelli*, serpiente hindú que ocasiona alrededor de 1,300 muertes por año. Evaluaron la actividad anti-edema y la actividad mionecrótica, obteniendo que el extracto de *V. vinifera* tuvo una completa abolición del edema, siendo la proporción más alta (1:20 w/w) la más efectiva. Por otro lado, la actividad mionecrótica fue inhibida por los extractos, de tal manera que las secciones de tejido presentaban estriaciones musculares normales parecidas al control.

Meenatchisundaram y Sindhu (2011) usando el extracto de raíz de dos plantas *Acorus calamus* y *Withania somnifera* evaluaron los efectos neutralizantes ante el veneno de *Echis carinatus*, en el estudio del efecto anti-edema, la cantidad de 4000µL de ambos extractos sobre mg de veneno fue la que redujo el edema en un 20%.

III. JUSTIFICACIÓN

Aun cuando el género *Erythrina* es usado en México y el mundo para tratar los accidentes ofídicos y, que en México existen referencias empíricas del uso de *Erythrina americana* contra la mordedura de serpiente y, después de una exhaustiva búsqueda de material bibliográfico es evidente la falta de estudios

científicos sobre el tema, de manera que en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos.

VI. HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico liofilizado obtenido de las de hojas de *Erythrina americana* planta mexicana mostrará/tendrá/tiene actividad neutralizante del edema generado por la administración del veneno de de *Bothros asper*.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

Objetivos particulares

- Realizar la extracción y el perfil fitoquímico del liofilizado de hojas frescas de *E. americana* Mill.
- Determinar la toxicidad aguda del liofilizado de hojas de *E. americana* Mill.
- Determinar la Dosis Mínima Edematizante (DME) del veneno de Nauyaca (*Bothrops asper*).
- Evaluar la reducción del edema plantar producido por la administración s.c. del veneno de Nauyaca (*Bothrops asper*) pre-incubado con el liofilizado de hojas.
- Caracterizar por electroforesis las proteínas del veneno de *Bothrops asper*.
- Realizar una electroforesis en gel del veneno previamente incubado con el liofilizado de hojas de *E. americana*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Material Vegetal

El material vegetal se recolectó de las zonas aledañas a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), ubicada en la Delegación Gustavo A. Madero. Los ejemplares colectados se trasladaron para su identificación botánica en el Herbario de la FESI, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

VI.2 Preparación de los extractos

Las hojas frescas de los ejemplares se lavaron, trituraron y maceraron en una mezcla etanol-agua (30:70). Posteriormente, el exceso de disolvente se retiró concentrando a presión reducida en un rotavapor BUCHI R-205 y el extracto acuoso se liofilizó (Liof) y se guardó en viales que permanecieron en refrigeración hasta su uso en los bioensayos.

VI.3 Animales

Se utilizaron ratones macho CD-1 (18-20 g) obtenidos del Bioterio de la FES Iztacala. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico transparente dentro del laboratorio L-514 de la Facultad. La temperatura del cuarto (21 °C ±1) fue constante y los animales recibieron comida y agua *ad libitum*.

VI.4 Veneno

El veneno de *Bothrops asper* fue proporcionado por el Doctor Agustín Álvarez Trillo encargado del Herpetario Reptilium del Zoológico de Zacango. La ordeña de dos serpientes la realizó el Dr. Alejandro Carvajal Saucedo. Una vez extraído el veneno se transportó en condiciones de congelamiento al Laboratorio de Cultivos Celulares de UPIBI, IPN y se liofilizó para conservarlo a 4°C hasta el momento del ensayo biológico.

VI. 5 Bioensayos

a) Toxicidad aguda (LD₅₀)

La dosis letal media se determinó siguiendo la metodología descrita por Lorke *et al.* (1983). Fase 1: grupos independientes de ratones (n=3) fueron administrados vía oral mediante cánula intragástrica con dosis de 10, 100 ó 1,000 mg/kg del liofilizado, realizando el registro de mortalidad por 24 horas. Fase 2: La selección de las dosis

para esta fase se estableció con base en los resultados obtenidos en la primera etapa; requiriéndose únicamente un sujeto por dosis, las observaciones se llevaron a cabo por 24 horas. El cálculo de la LD₅₀ se obtuvo a partir de la media geométrica entre la dosis máxima administrada con sobrevivencia y la dosis mínima que produjo mortalidad.

b) Dosis Mínima Edematizante (DME)

Para este bioensayo se siguió el método descrito por Yamakawa *et al.* (1976) modificado por Gutiérrez *et al.* (1986). Grupos de cinco ratones se inyectaron subcutáneamente (s.c.) en la extremidad posterior derecha con distintas cantidades de veneno (1.0, 1.5 y 2.0 µg) disueltos en 20 µL de Buffer de fosfatos salino (PBS), pH 7.2. La extremidad izquierda se inyectó de manera similar con 20 µL de PBS (control). Se midieron ambas extremidades en intervalos de 0, 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 3.5 h, 4 h y 4.5 h. El edema se calculó como el porcentaje de incremento en grosor de la extremidad. La dosis mínima edematizante correspondió a la cantidad de veneno que produjo el 30% de edema una hora después de la administración de sus diferentes cantidades.

c) Neutralización del edema por el liofilizado del *Erythrina americana* (Test del edema plantar)

Para esta evaluación se siguió el método descrito por Yamakawa *et al.* (1976) con algunas modificaciones. Brevemente, con ayuda de un vernier electrónico se midió el grosor de la extremidad posterior derecha e izquierda de los ratones después de distribuirlos al azar en grupos independientes (n=6). Las mezclas de veneno/extracto se disolvieron en 20 µL de Buffer fosfato salino (PBS), pH 7.2 y se preincubaron por 30 minutos a 37°C. Una vez anestesiados los animales se procedió a la inoculación de los tratamientos. El GLiof fue inyectado con 25 µg de liofilizado de hojas (Liof) mientras que el grupo G0 (control negativo) fue inyectado con 20 µL de Buffer fosfato salino (PBS), al grupo GV se le inyectaron 1.5 µg de veneno. Las distintas cantidades de liofilizado de hojas fueron mezcladas con una cantidad fija de veneno (1.5 µg). Al grupo G2 se le administraron 2 µg de Liof, al

grupo G5 se le administraron 5 µg de Liof; el Grupo G10 recibió 10 µg de Liof y el G15 recibió 15 µg de Liof. Se midió el cambio en el grosor de ambas extremidades en intervalos 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos después de la inyección subplantar. Los resultados fueron reportados como porcentaje de aumento de grosor de la pata. Las cantidades a utilizar de cada extracto fueron determinadas en función de la LD₅₀.

VI.6 Electroforesis del veneno de *Bothrops asper*

La electroforesis en gel se realizó por el método de Leammli (1970) que consiste en utilizar dos geles: un gel concentrador y un gel separador. La concentración del gel separador fue de 12% y un gel separador 5%. Se prepararon muestras de veneno (0.05, .1 y 0.2%), de proteína al 0.5% de albúmina y proteasa así como un marcador de PM= 2.5-200 kDa. Se aplicaron 20 µL de cada una de las muestras en cada pozo, la electroforesis se corrió a 200 V y 60 mA por 91 minutos. Las proteínas separadas se revelaron con Azul de Coomassie.

VI.6.1 Electroforesis del veneno pre-incubado con el liofilizado de hojas de *E. americana*

La electroforesis se realizó siguiendo el método de Leammli (1970), con base en los resultados de edema plantar, se prepararon muestras de veneno:liofilizado (1:1, 1:3, 1:5 y 1:10 v/v), otra muestra de veneno:antiveneno polivalente Antivipmyn® del Instituto Bioclon en proporción 1:10. Las muestras de veneno:liofilizado y veneno:antiveneno se pre-incubaron a 37°C por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, fueron sembrados 20 µL de cada una de las muestras la electroforesis se corrió a 200 V y 60mA por 48 minutos. Muestras del antiveneno al 0.2%, veneno al 0.2%, proteína control: proteasa al 0.5% así como un marcador de PM= 2.5-200 kDa también se sembraron en el gel. Las proteínas se revelaron con Azul de Coomassie.

VI.7 Ensayos Químicos del liofilizado de hojas de *E. americana*

a) Análisis Preliminar fitoquímico

El análisis preliminar fitoquímico para la detección de compuestos presentes en el Liofilizado de *Erythrina americana* se realizó de acuerdo al método descrito en el Manual de Prácticas de Productos Naturales (Valencia & Garín, 2010). Al liofilizado de hojas frescas de *Erythrina americana* Mill. se le realizaron pruebas para determinar la presencia de alcaloides (Reacción Dragendorff), flavonoides (Reacción hidróxido de sodio & Reacción de Shinoda), glicósidos cianogénicos (Reacción de Grignard), azúcares reductores (Reacción de Benedict & Reacción de Fehling), saponinas (Reacción de Liebermann Bouchard & Reacción de Rosenthaler), quinonas (Reacción de hidróxido de amonio & Reacción de ácido sulfúrico), taninos (Reacción de gelatina, Reacción de cloruro férrico & Reacción de ferricianuro de potasio), cumarinas (Reacción de Erlich) y glucósidos cardiacos (Reacción de Baljet y Reacción de Legal).

Para la identificación de taninos, flavonoides y compuestos fenólicos se desarrollaron cromatografías en capa fina, usando como reveladores Cloruro férrico 5%, el complejo Difetil-ácido bórico-etanoamina-Polietilenglicol y solución de Folin + solución básica 1:1, respectivamente.

b) Cuantificación de flavonoides totales

Al liofilizado (0.2685 g) se le agregaron 3 mL de metanol al 80%, se dejaron en baño de ondas ultrasónicas por 10 minutos seguido de un descanso de cinco minutos y otros 10 minutos en el baño. Se llevó a la centrifuga 5804 por 10 minutos a 5000 rpm. A esta muestra se le adicionaron 2 mL de acetato de potasio 1M y 2 mL de $AlCl_3$ después de 40 minutos a temperatura ambiente se obtuvo la absorbancia en un espectrofotómetro a 415 nm. Se realizó la curva patrón para flavonoides usando una solución stock de quercetina. Los análisis se realizaron por triplicado (Chang *et al.*, 2002).

c) Cuantificación de ácidos fenólicos

Al liofilizado (0.2685 g) se le agregaron 3 mL de metanol al 80%, se dejaron en baño de ondas ultrasónicas por 10 minutos seguido de un descanso de cinco

minutos y otros 10 minutos en el baño. Se llevó a la centrifuga 5804 por 10 minutos a 5000 rpm. A esta muestra se le adicionaron el volumen de agua correspondiente para alcanzar los 500 μL , seguido de 25 μL de reactivo de Folin y 975 μL de Na_2CO_3 al 2.5%. Se dejaron una hora a temperatura ambiente y posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 740 nm. La curva patrón para flavonoides se realizó usando un estándar de ácido gálico. Los análisis se realizaron por triplicado (Chang *et al.*, 2002).

d) Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía para el análisis de ácidos fenólicos se realizó en una columna Nucleosil 100 A^o 125 x 4 mm usando un gradiente lineal de 1 mL min^{-1} de agua (Solución A) y Acetonitrilo (Solución B). Inicialmente 85% de solución A y 15% de solución B, 20 minutos 65% de solución A y 35% de solución B y 23 minutos 65% de solución A y 35% de solución B, volumen de inyección: 5 μL .

Para los flavonoides la cromatografía se realizó en una columna hypersil ODS 100Å de 125x4 mm, ajustada a 30°. El sistema se operó con elusión en gradiente con solución A: H₂O (pH 2.5) con TFA y solución B: Acetonitrilo, con un gradiente lineal de 1 mL min^{-1} . Inicialmente 85% de la solución A y 15% de solución B, 20 minutos 65% de solución A y 35% de solución B y 25 minutos 65% de solución A y 35% de solución B, volumen de inyección: 5 μL .

VI.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente con un análisis de varianza de una vía y análisis de medias repetidas. Se utilizó la prueba post-hoc de Duncan y para el porcentaje de edema a los 60 minutos se utilizó la prueba post-hoc de Tukey para determinar las diferencias entre las medias. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo; mientras que, para los resultados de neutralización del edema un valor de $p < 0.001$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se expresaron como media \pm ESM.

VII. RESULTADOS

VII.1 Material Vegetal

Información Taxonómica (Instituto de Biología, 2010)

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae (Faboideae)

Género: *Erythrina*

Especie: *Erythrina americana* Mill.

Descripción botánica

E. americana. Árbol con espinas gruesas, foliolos cartáceas, ampliamente ovados a suborbiculares o deltoide-ovados, 4-13 cm largo, acuminado o agudo, al principio tomentoso y luego glabro; cáliz cartácea, campanulado, de 8-12 mm de largo; estandarte rojo, angostamente elíptico, 3.5- 6.5 cm de largo y 8.12 mm de ancho, redondeado u obtuso en el ápice; alas 7-12 mm de largo, mas largo que la quilla; vaina de 9-20 cm de largo, 11-14 mm de espesor, muy constreñida entre las semillas, las semillas son de color rojo escarlata con una línea negra (Standley & Steyermark, 1946).

VII.2 Veneno

La ordeña se realizó a ejemplares silvestres del Zoológico de Zacango. Un macho con una longitud total de 161 cm procedente de los Tuxtlas, Veracruz y una hembra procedente de la Selva de los Chimalapas en Oaxaca. En la Figura 26 se ilustra el momento de la ordeña del ejemplar macho de *Bothrops asper*.



Figura 26. Nauyaca macho del Herpetario Reptilium en el Zoológico de Zacango.

VII.3 Bioensayos

a) Toxicidad aguda (LD₅₀)

La administración del liofilizado no manifestó signos o síntomas de toxicidad aún en las dosis más altas (1,600, 2,900 ó 5,000 mg/kg) propuestas por Lorke *et al.* (1983). El peso corporal se comportó de acuerdo a la curva de crecimiento para esta especie.

b) Dosis mínima edematizante (DME)

Como se indicó para el ensayo biológico fue necesario determinar previamente la dosis mínima edematizante, que corresponde a la cantidad de veneno que provocó un edema del 30%. El % de edema se determinó 1 hora después de la inyección del veneno ya que es el momento del edema máximo. Después de este tiempo el edema de la pata tiende a disminuir acompañando el tejido de hemorragia y necrosis (Figura 27). Los datos de edema obtenidos al administrarr 1, 1.5 y 2 µg de veneno se sometieron a un ANOVA de una vía, que detectó diferencias significativas [$F_{(2,12)}= 7.552$, $p<0.05$] y la prueba post-hoc Duncan formó dos grupos,

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

en uno se ubicó 1 μ g de veneno y en el otro 1.5 y 2.0 μ g de veneno. En la Figura 28 se observa que 2.0 μ g fue la cantidad de veneno que provocó el 30% de edema.

VENENO 1 μ g/20 μ L VENENO 1.5 μ g/20 μ L



VENENO 2 μ g/20 μ L



Figura 27. Pata Derecha con las cantidades de veneno (1.0 μ g, 1.5 μ g y 2.0 μ g) y pata izquierda con 20 μ L del vehículo (PBS) a las 4.5 h de la inyección de veneno.

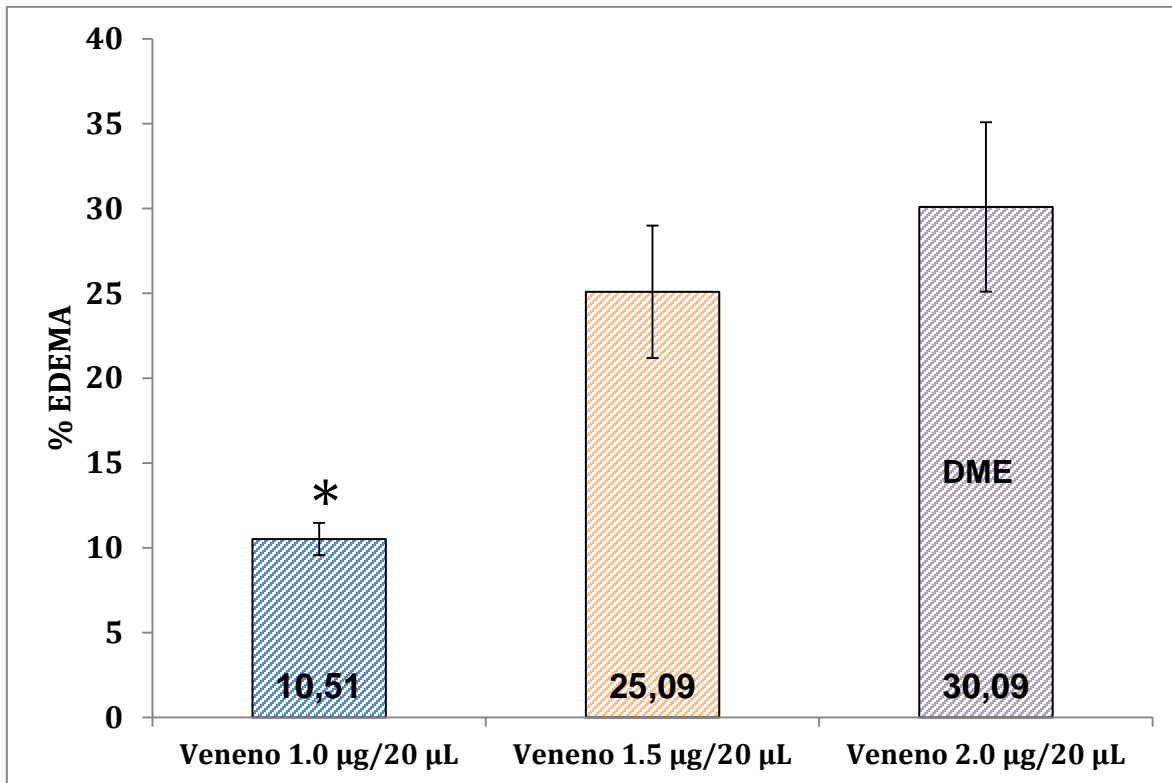


Figura 28. Dosis mínima edematizante (DME) del veneno de *Bothrops asper*. En el intervalo de una hora. Los resultados se reportan como la media \pm ESM. El asterisco (*) indica diferencias significativas, prueba post-hoc de Duncan ($p < 0.05$, $n = 5$).

c) Neutralización del edema por el liofilizado del *Erythrina americana* (Test de Edema Plantar)

Para evaluar la neutralización del edema usando el Test de edema plantar, distintas cantidades de liofilizado se incubaron con una cantidad fija de veneno de *B. asper* (1.5 µg). Los resultados de este experimento de neutralización se muestran en la Figura 29. El ANOVA de medidas repetidas indicó que las cantidades de liofilizado (2, 5, 10, 15 µg) previamente incubado con el veneno redujeron de forma significativa el edema a lo largo del tiempo [$F_{(4,25)} = 15.936$, $p = 0.0001$]. La prueba post-hoc de Duncan formó cuatro grupos: Grupo “a” (Veneno 1.5µg), Grupo “b” (Veneno + Liof 2µg), Grupo “c” (Veneno+ Liof 5µg) y el Grupo “d” (Veneno + Liof 10µg, Veneno + Liof 15µg) (Figura 23). En la Figura 30 se puede observar el aspecto normal y la inflamación casi imperceptible de la pata derecha del tratamiento que recibió veneno incubado con 15 µg de Liofilizado, cantidad que presentó un porcentaje de edema de 12.85%.

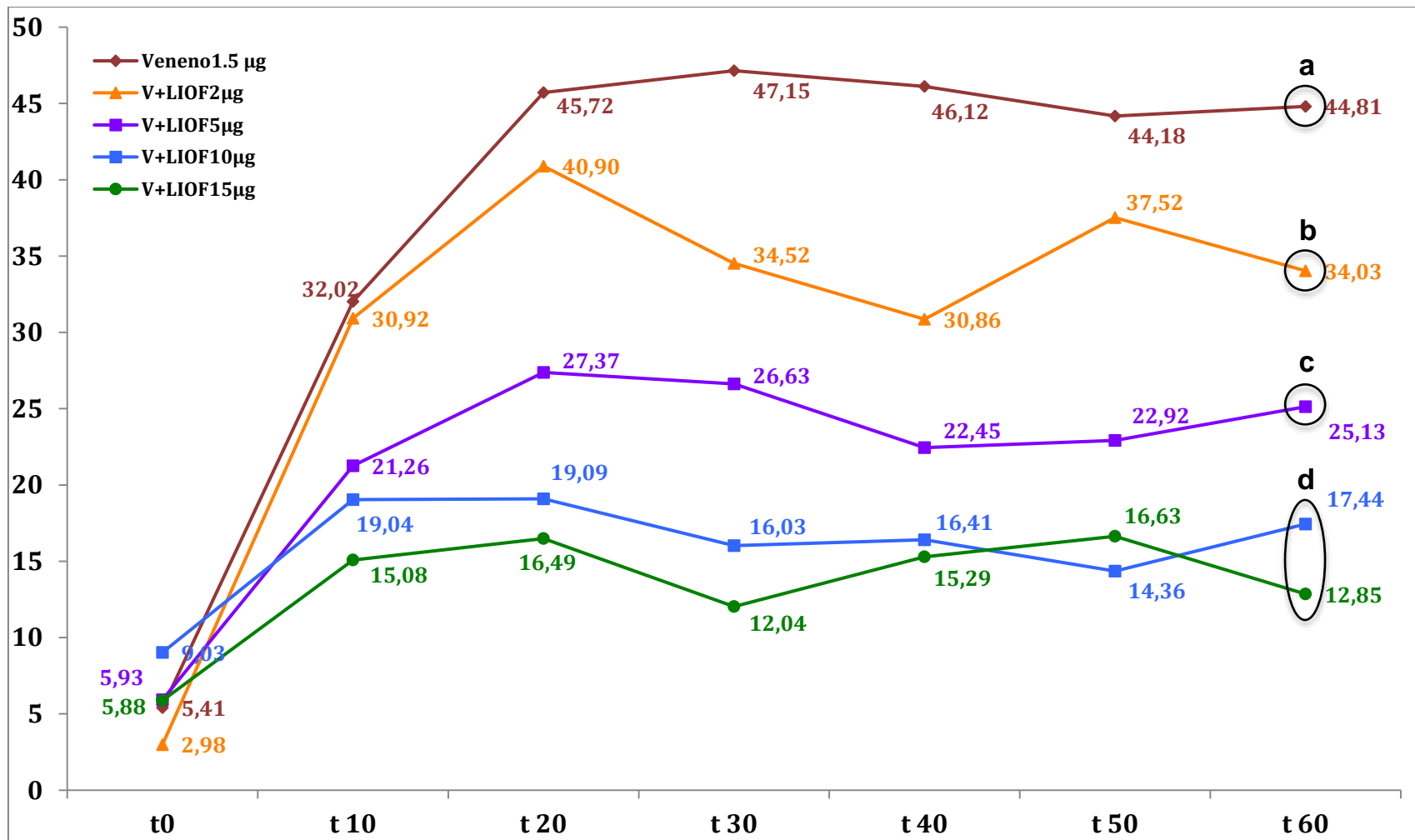


Figura 29. Neutralización del edema. Cinética del tiempo en intervalos de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos de duración del experimento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p=0.0001$, $n= 6$).

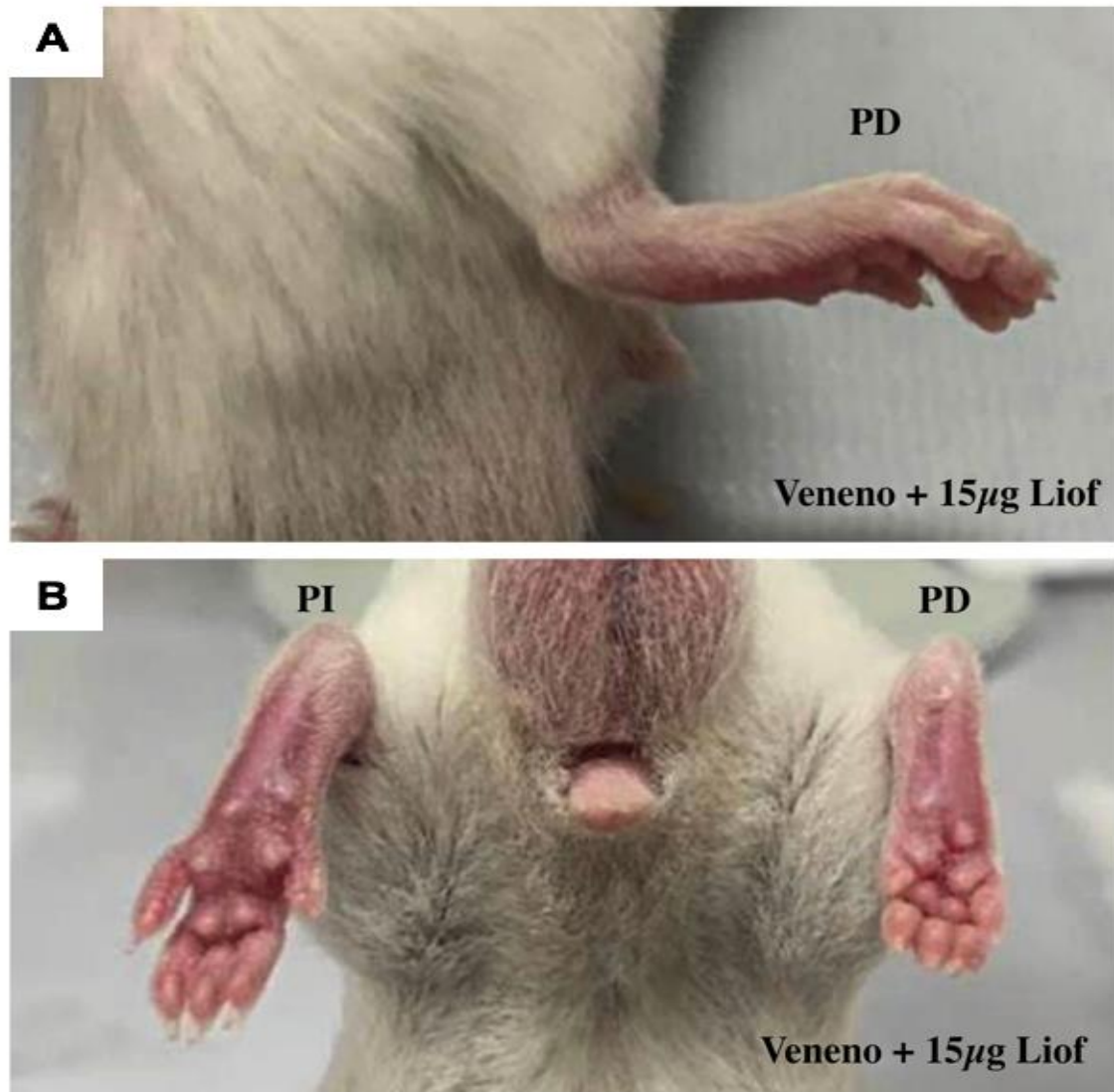


Figura 30. Se muestra la pata derecha (PD) y la pata izquierda (PI) del grupo G15 el cual constaba de veneno preincubado con 15 µg de Liofilizado de hojas en 20µL de vehículo. A) vista del perfil de la pata derecha (PD) y B) vista frontal de ambas patas derecha e izquierda.

En la Figura 31 se muestran los resultados del porcentaje de edema para cada tratamiento justo a los 60 minutos (máxima expresión del edema). Los datos de edema en este tiempo se analizaron con una ANOVA de una vía, la que detectó diferencias significativas entre los tratamientos [$F_{(6,35)} = 16.489$, $p=0.0001$]. La prueba Post-hoc de Tukey formó tres grupos, el grupo “a” conformado por: PBS, Liof 25 μ g, Veneno + Liof 10 μ g y Veneno + Liof 15 μ g y el grupo “b” conformado por: el Veneno + Liof 5 μ g y el grupo “c” conformado por: Veneno + Liof 2 μ g y Veneno. Se observa que la neutralización del veneno con 10 y 15 μ g de liofilizado redujeron el edema hasta un 17.44% y 12.85% respectivamente.

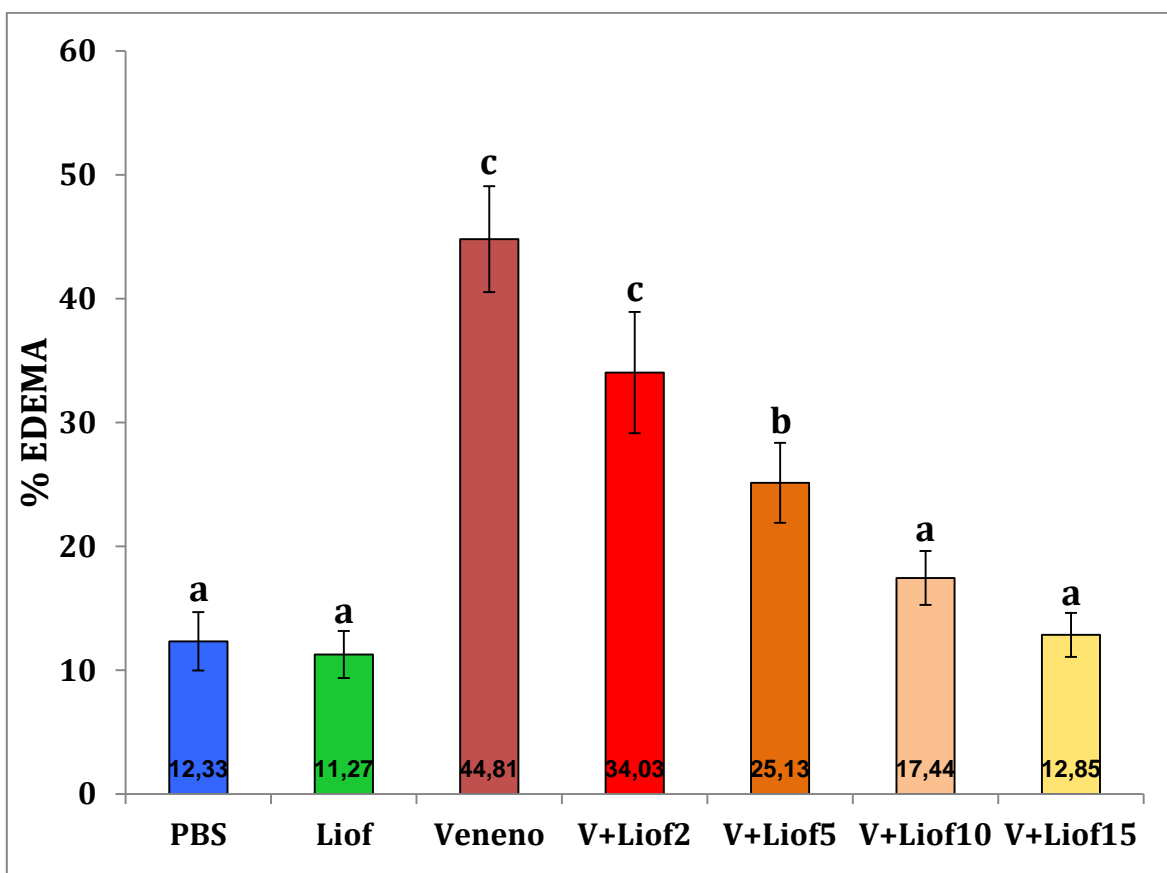


Figura 31. Porcentaje de edema a los 60 minutos. Los experimentos se realizaron preincubando cantidades de liofilizado 2-15 μ g con la cantidad fija de veneno (1.5 μ g) por 30 min a 37°C. Los resultados se reportan como la media \pm ESM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p=0.0001$, $n=6$).

VII.3 Electroforesis del veneno de *Bothrops asper*

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de las dos muestras de veneno (Zacango y Chapultepec) para caracterizar el veneno. En la Figura 32 se muestra el patrón electroforético del veneno de *B. asper* donado en el Zoológico de Zacango (A, B y C) y el Zoológico de Chapultepec (D, E y F), de una albúmina (ALB) y una proteasa (PROT) y el marcador molecular (MW). Los venenos presentaron bandas con pesos de 116.3, 55.4, 14.4, 3.5 y 2.5 kDa. Se observa que ambas muestras de veneno tienen patrones electroforéticos semejantes, pero con una definición de bandas más nítida en la muestra de Zacango (Figura 26).

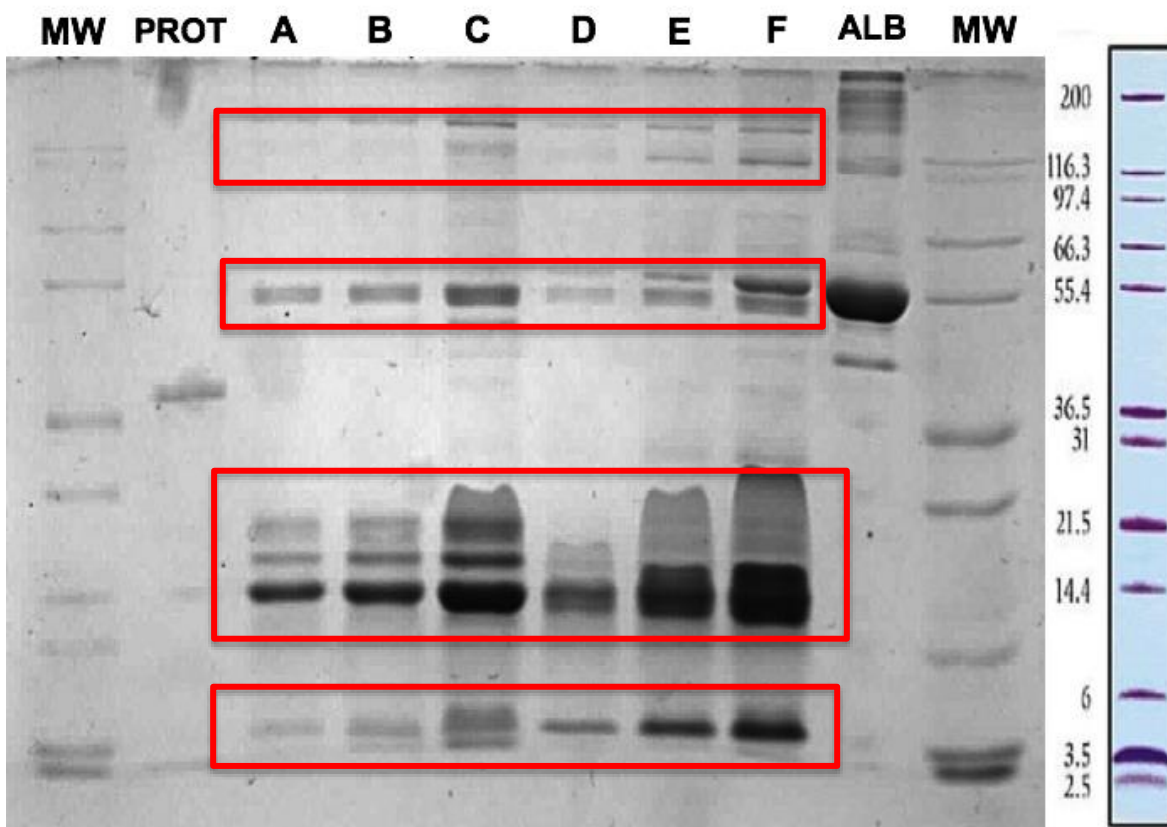


Figura 32. SDS-PAGE del veneno de especies de *Bothrops asper*; Veneno de dos serpientes del Zoológico de Zacango con distintas concentraciones 0.2 (A), 0.1 (B) y 0.05% (C) y veneno de la serpiente del Zoológico de Chapultepec 0.2 (D), 0.1 (E) y 0.05% (F), junto con el marcador molecular MW (200- 2.5 kDa). Señalados por cuadros rojos se observan las bandas con pesos de 116.3, 55.4, 14.4, 3.5 y 2.5 kDa.

VII.3.1 Electroforesis del veneno pre-incubado con el liofilizado de hojas de *E. americana*

En la Figura 33 se muestra la electroforesis obtenida con muestras de Veneno: liofilizado en diferente proporción (1:1, 1:3, 1:5 y 1:10). Aquí se observa que conforme se incrementó la cantidad de liofilizado el patrón electroforético de las mezclas Veneno-Liofilizado presentó una ligera disminución en la intensidad de las bandas de 36.5, 3.5 y 2.5 kDa. En cuanto al suero antiviperino Antivipmyn® (S) se observan bandas a partir de los 200 kDa hasta los 97.4 kDa, y a los 66.3 kDa.

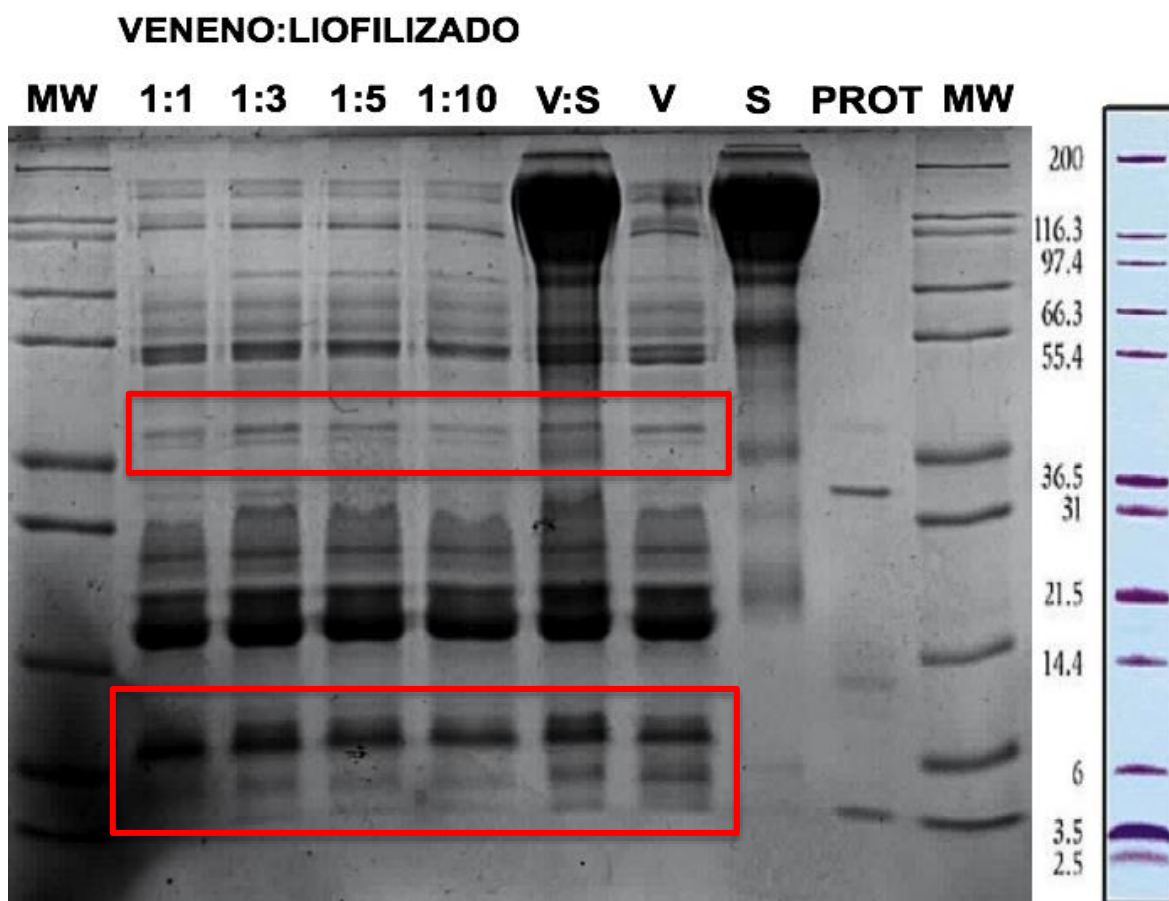


Figura 33. SDS-PAGE del veneno *Bothrops asper* después de incubado con el liofilizado de hojas de *Erythrina americana* (1:1, 1:3, 1:5 y 1:10, v/v, 30 min, 37°C), veneno solo (V), suero antiviperino ANTIVIPMYN® solo (S), el suero antiviperino ANTIVIPMYN® incubado con veneno (V:S), marcador molecular MW (200- 2.5 kDa) y la proteína control: proteasa (PROT). Señalados con cuadros rojos se observan los cambios en el patrón electroforético del veneno causados por *Erythrina americana*.

VII.4 Ensayos Químicos del liofilizado de hojas de *E. americana*

a) Análisis Preliminar fitoquímico

En el Cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos del preliminar fitoquímico realizado al liofilizado de hojas, el símbolo (-) indica la ausencia del metabolito, (++) indica una presencia escasa y el símbolo (+++) indica una presencia abundante del metabolito en las hojas de *E. americana* Mill.

Metabolito	Reacción	Liofilizado de hojas frescas de <i>E. americana</i>
Alcaloides	Reacción Dragendorff	-
Flavonoides	Reacción NaOH	+++
	Reacción de Shinoda	-
Glicósidos cianogénicos	Reacción de Grignard	-
Azúcares reductores	Reacción de Benedict	++
	Reacción de Fehling	-
Saponinas	Reacción Lieberman-Bouchard	+
	Reacción Rosenthaler	+++
Taninos	Reacción de gelatina	+++
	Reacción de cloruro férrico	+++
Quinonas	Reacción de hidróxido de amonio	++
	Reacción de ácido sulfúrico	++
Cumarinas	Reacción de Erlich	++
Glicósidos cardiacos	Reacción de Baljet	++
	Reacción de Legal	-

Cuadro 1. Resultados del análisis preliminar fitoquímico del liofilizado de hojas frescas de *Erythrina americana* Mill.

En la Figura 34 se muestran las cromatografías realizadas para identificar la presencia de taninos, compuestos fenólicos y flavonoides. La fase móvil que se usó fue metanol para darle polaridad y que los compuestos presentes en el extracto se separaran.

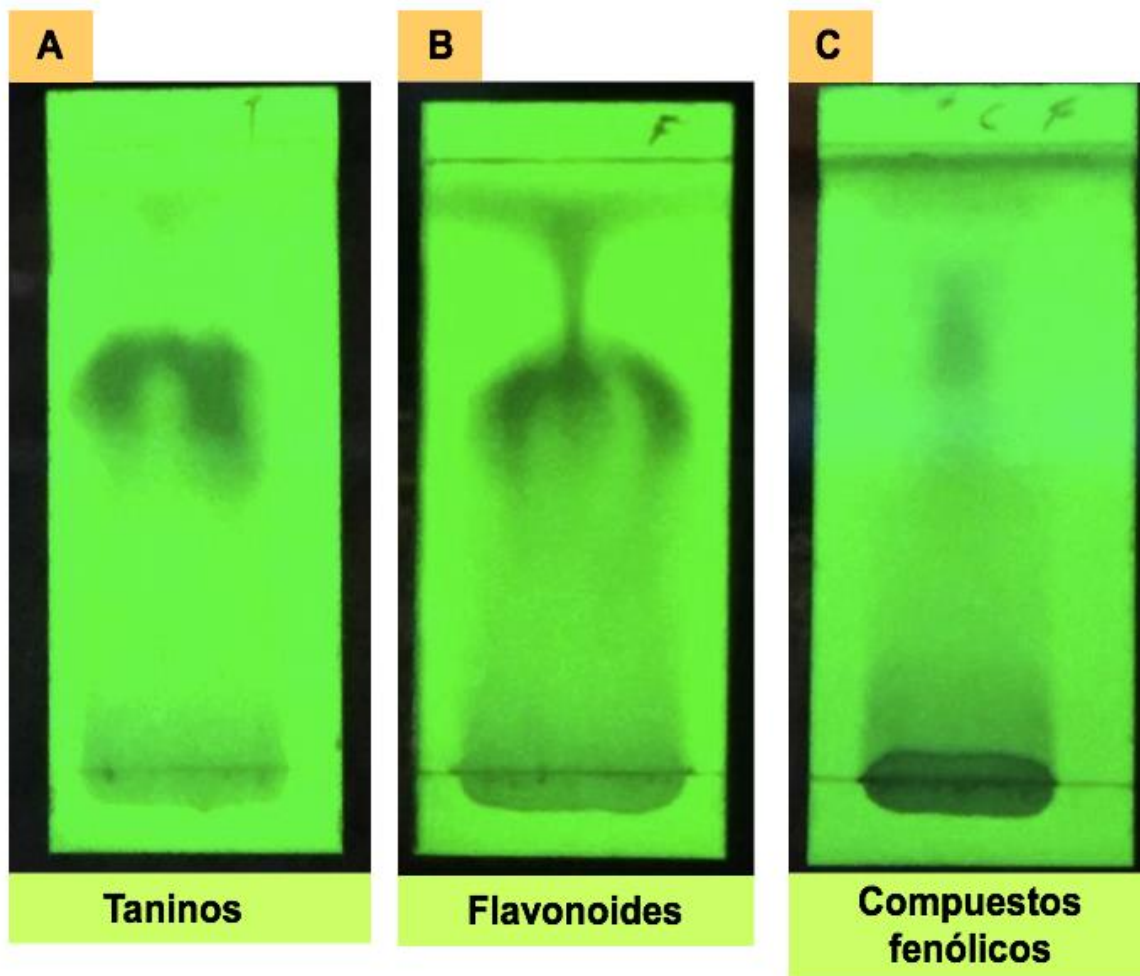


Figura 34. Cromatografía en capa fina realizada al liofilizado de hojas de *Erythrina americana* Mill. Imagen 20A muestra presencia de Taninos (Cloruro férrico), imagen 20B la presencia de compuestos fenólicos (Complejo difenil-ácido bórico-etanoamina-Polietilenglicol) y la imagen 20C la presencia de flavonoides (Solución Folin).

a) Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en el liofilizado de hojas de *E. americana* fue el siguiente:

Muestra	Concentración (mgQuercetina/mL/gExtracto)
Liofilizado de Hojas de <i>Erythrina americana</i>	14.415 ± 0.49

b) Cuantificación de ácidos fenólicos

El contenido de ácidos fenólicos en el liofilizado de hojas de *E. americana* fue el siguiente:

Muestra	Concentración (mgGal/mL/gExtracto)
Liofilizado de Hojas de <i>Erythrina americana</i>	25.116 ± 0.24

c) Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El análisis HPLC reveló la presencia de los siguientes ácidos fenólicos en el liofilizado de hojas de *Erythrina americana*: ácido gálico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido vainilínico, ácido p/ hidroxibenzoico, ácido cafeico y ácido p/ coumárico (Figura 35). Mientras que El análisis HPLC reveló la presencia de los siguientes flavonoides en el liofilizado de hojas de *Erythrina americana*: Apigenina, Rutina, Florizidina, Mirecetina, Quercetina y Galanginina (Figura 36).

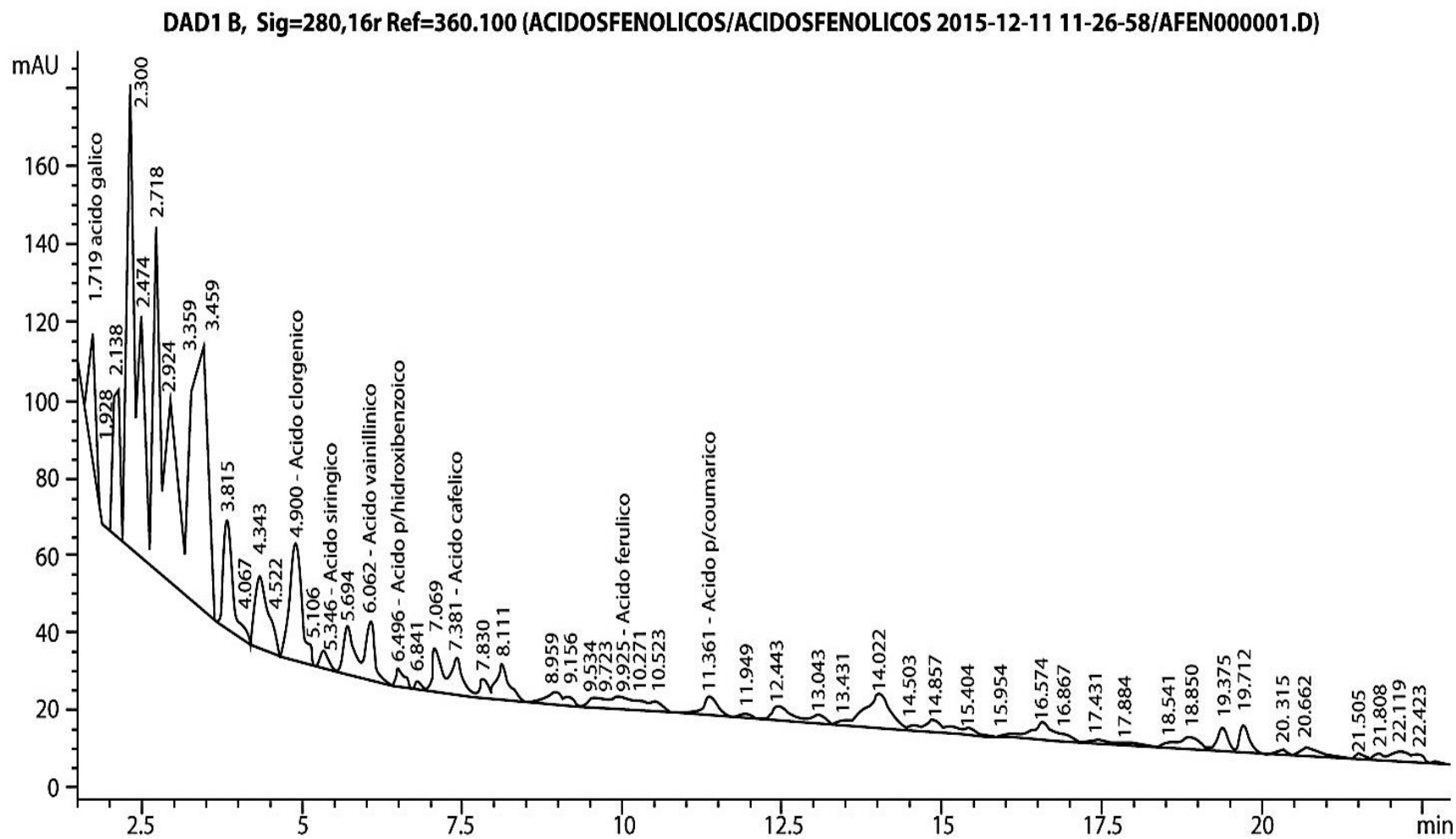


Figura 35. HPLC de ácidos fenólicos realizado al liofilizado de hojas de *E. americana*.

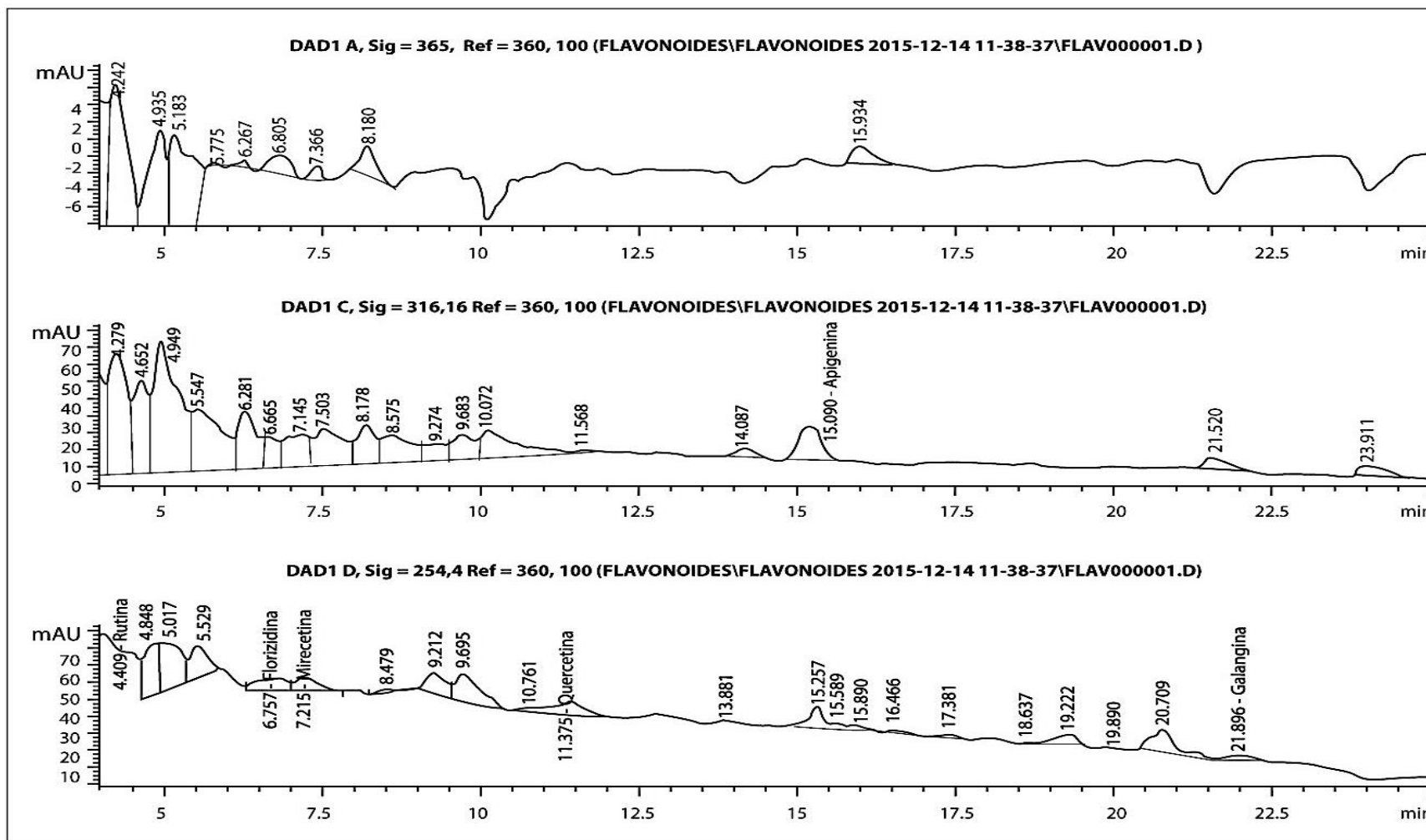


Figura 36. HPLC de flavonoides presentes en el liofilizado de hojas de *E. americana*.

VIII. DISCUSIÓN

El género *Erythrina* ha sido estudiado desde diferentes perspectivas; ya sea por su efecto anti-inflamatorio, anti-nociceptivo o analgésico, a su vez, el género es usado en México y diversas partes del mundo para combatir los efectos causados por la mordedura de serpiente.

Es en los estudios etnobotánicos donde se reporta que *Erythrina americana* es administrada por vía oral para atender los accidentes ofídicos (Ramos-Hernández et al., 2007; Garrido, 1997). Para respaldar el uso que dan las comunidades a la planta se realizó el ensayo de toxicidad aguda, en el cual los ratones a los que se les administró el liofilizado de *E. americana*, no presentaron signos o síntomas de toxicidad, aún en las dosis más altas de 1,600, 2,900 ó 5,000 mg/kg. Con base en el criterio de Hodge & Sterner (2005) las sustancias que administradas a ratas presentan una LD₅₀ de 500-5,000 mg/kg son consideradas como ligeramente tóxicas mientras que las sustancias con LD₅₀ de 5,000-15,000 mg/kg pueden considerarse prácticamente no tóxicas. También aplicando las categorías de toxicidad establecidas por Kennedy et al. (1986) el liofilizado de hojas de *Erythrina americana* resultó ser no tóxico. Estos resultados de nula toxicidad pueden explicar el uso etnofarmacológico que en la localidad de Rodríguez Sayula, Veracruz se le da a las hojas de *Erythrina americana*, las que se utilizan en cocción e incluso las hojas frescas son masticadas para contrarrestar la acción del veneno viperino (Ramos-Hernández et al., 2007). Se observó que durante la determinación de la LD₅₀, los animales tampoco presentaron pérdidas en el peso corporal, las cuáles se han asociado a la movilización de reservas energéticas para enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de desintoxicación (Sotolongo, 1988), se puede inferir que la estabilidad en el peso corporal de los ratones durante este ensayo, se debió a una baja o nula toxicidad del extracto.

La dosis mínima del veneno de *Bothrops asper* que provocó un edema plantar del 30% fue de 2.0 µg/20µL de PBS. Dentro de la familia Viperidae, Alam & Gomes

(2003) encontraron que la dosis mínima edematizante del veneno de *Vipera russellii* fue de 1µg en 0.01mL, con el veneno de *Bothrops atrox* fue de 0.84 µg en 50 µL (Duque-Zerpa *et al.*, 2014) y la DME para *Bothrops asper* fue de 1.5 µg en 50 µL (Núñez *et al.*, 2004). Las diferencias en el valor de la dosis mínima edematizante que encontramos con respecto a la reportada por Núñez *et al.* (2004), pueden deberse a la procedencia del veneno, el veneno de éstos autores provenía de la ordeña de más de 40 especímenes silvestres capturados en el Norte de Colombia, mientras que el veneno usado en este estudio se obtuvo de dos especímenes de *B. asper* actualmente en cautiverio, provenientes de Veracruz y Oaxaca. Otro fenómeno que puede explicar estas diferencias es que las fosfolipasas A₂ del veneno de serpientes, responsables del efecto edematizante, son enzimas que alcanzaron la máxima diversidad evolutiva, difiriendo considerablemente en los efectos farmacológicos que producen (Ohno *et al.*, 2003; Gibbs & Rossiter, 2008).

Con respecto al tiempo de duración del edema, este experimento de dosis mínima edematizante mostró que la inoculación del veneno (1.0, 1.5 y 2.0 µg) produjo un edema de rápida aparición con duración de una hora sin hemorragia y fue dosis dependiente. Ya fue señalado por Lomonte *et al.* (1993) que existe una relación entre la duración del edema y la dosis de veneno de *B. asper* inyectada y que se generan dos tipos de respuestas: en dosis bajas de veneno (1 µg), se desarrolla un edema rápido y transitorio, con ausencia de hemorragia, y con escasa infiltración de leucocitos; sin embargo, con dosis altas (50 µg), el edema fue rápido y se sostuvo por un periodo más largo y estuvo acompañado de hemorragia, mionecrosis, e infiltración abundante de leucocitos. Nuestros resultados también son consistentes con otros estudios donde el edema plantar en ratón se produjo con la administración del veneno de especies bothropicas, *Bothrops asper* (2.5 µg) y *Bothrops jararaca* (0.75 µg) generando un incremento acelerado en la formación del edema, con respuestas máximas entre los 30 minutos y una hora (Olivo *et al.*, 2007). Otero-Patiño (2007) señaló que las características clínicas del envenenamiento por *Bothrops asper* son similares en América Central y

Sudamérica e incluyen entre otras, el edema en el 95% de los casos, el cual es detectable como síntoma clásico de envenenamiento a los 5 minutos de la inoculación.

Importantes resultados arrojó el estudio de neutralización del edema plantar por el liofilizado del *Erythrina americana*. El porcentaje de edema fue de 34.03, 25.13, 17.44 y 12.85 % cuando la cantidad fija de veneno 1.5 µg de *B. asper* se incubó con 2, 5, 10 15 µg de liofilizado de hojas, respectivamente. Se observa que la mayor neutralización del edema ocurrió con 10 y 15 µg de liofilizado, mientras que 2 y 5 µg presentaron menor eficacia para reducir el edema. Es evidente que la neutralización del edema tiene un efecto dosis-dependiente.

En un estudio de neutralización (Borges *et al.*, 2000) se reportó que la preincubación de una cantidad fija de veneno de *Bothrops moojeni* (50 µg) o su miotoxina II (100 µg) con el extracto acuoso de hojas de *Casearia sylvestris* en concentraciones w/w de 1:20 y 1:10, alcanzaron una inhibición del edema plantar alrededor del 50%. Es importante hacer notar que en el estudio de neutralización el liofilizado de hojas de *Erythrina americana* presentó una mayor actividad pues 10 y 15 µg, fueron suficientes para reducir el edema en un 17 y 12% respectivamente.

En otro estudio de neutralización *in vitro* del veneno de *B. asper* con extractos etanólicos de doce plantas diferentes (Núñez *et al.*, 2004) se informó que para alcanzar el porcentaje de neutralización más alto ($72 \pm 5\%$), el veneno (1 µg) se incubó con 100 µg de extracto etanólico de *Bixa Orellana*; cantidad casi 5 veces superior a la usada para alcanzar 12.85 % de edema lo que equivaldría a un 87.15% de neutralización con el liofilizado de hojas de *E. americana*.

Así mismo, Maiorano *et al.* (2005) necesitaron que la cantidad fija de los venenos de *Bothrops jararacussu* y *Crotalus durissus terrificus* (10 o 2 µg/µL) se incubaran en proporción 1:50 (w/w) con los extractos acuosos de raíz fresca o raíz seca de *Mikania glomerata* para inhibir el edema alrededor de un 40%.

Mientras que Meenatchisundaram *et al.* (2009) redujeron el edema plantar en un 30% neutralizando el veneno de las serpientes *Naja naja* y *Bangarus caeruleus* con el extracto acuoso de raíz de *Mimosa pudica* en proporción 1:2.5. Los autores también encontraron que el efecto no fue dosis dependiente.

Es evidente que hasta el momento de la revisión, las proporciones de los extractos de plantas evaluados en experimentos de neutralización *in vitro* del veneno requieren cantidades superiores a la cantidad que se requirió de liofilizado de hojas de *E. americana* para neutralizar el veneno de *B. asper*.

En esta línea de trabajo también se han realizado algunos estudios de neutralización *in vivo* de venenos; entre ellos destacan el de Félix-Silva *et al.* (2014). Los autores reportaron que 100 y 200 mg/kg del extracto acuoso de hojas de *Jatropha gossypifolia* L. administrados por vía oral 60 minutos previos a la administración intraplantar de 3 µg/50 µL de veneno de *Bothrops jararaca* manifestaron su efecto a partir de los 90 minutos de la inyección del veneno inhibiendo la respuesta edematogénica en un 40% a los 120 minutos.

Posteriormente, los autores evaluaron el efecto de la administración del extracto acuoso de *Jatropha gossypifolia* L. (400mg/kg) y del antiveneno polivalente (100 µL/ratón) administrados por vía intraperitoneal, en un caso 60 minutos antes y en el otro 1 minuto después de la administración intraplantar del veneno de *B. erythromelas* (1 µg/50 µL). Observaron que cuando el extracto acuoso se administró 60 minutos antes de inyectar el veneno, se alcanzó un porcentaje inhibitorio de 66.3%; mientras que cuando se administró un minuto después de la inyección del veneno el porcentaje de inhibición fue menor (42.8%). Es importante señalar que una visión más completa del fenómeno se obtendrá completando los estudios *in vitro* evaluando los efectos *in vivo* del liofilizado de hojas de *E. americana*.

De modo tal que pudiéramos conocer el perfil proteico del veneno que se estaba utilizando en los ensayos *in vivo* se realizó una electroforesis del veneno de

Bothrops asper. Los patrones electroforéticos obtenidos con los venenos de especímenes de *Bothrops asper* de los dos herpetarios (Zacango y Chapultepec) fueron comparados con los valores de peso molecular de los componentes más comunes en el veneno de vipéridos reportados por Mackessy (2009). Este autor señala que las fosfodiesterasas y las L-aminoácido oxidasas se encuentran alrededor de los 94-140 kDa y 85-150 kDa, respectivamente. Las metaloproteasas P-III, P-II Y PI que se encuentran alrededor de los 43-85 kDa, 25-30 kDa y 20-24 kDa, respectivamente. Las serinoproteasas se encuentran entre los 31-36 kDa. Las fosfolipasas A₂ (Grupo II) se encuentran entre los 13-15 kDa.

Considerando esta información y los valores de las bandas observadas en la electroforesis, cuyos pesos moleculares oscilaron entre 116.3, 55.4, 21.5-14.4, 3.5 y 2.5 kDa, es probable que el veneno de ambas muestras (Zacango y Chapultepec) esté constituido por fosfodiesterasas, L-amino oxidasas, metaloproteasas P-III, serinoproteasas y fosfolipasas A₂.

Específicamente, el análisis del perfil electroforético del veneno de *B. asper* indica la presencia de proteínas con peso de 125 kDa correspondientes a la L-aminoácido oxidasa, así como sus isoenzimas Laao 1, Laao 2a y Laao 2b (Umaña, 1982); con 55 kDa se encontró la metaloproteasa P-III (BH3) (Borkow *et al.*, 1993) y entre los 11-15 kDa a las fosfolipasas A₂ (miotoxina I, II, III, IV) (Gutiérrez *et al.*, 1984; Kaiser *et al.*, 1990; Lomonte & Gutiérrez, 1989; Díaz *et al.*, 1995) (Angulo & Lomonte, 2009). Por otro lado, De Roodt *et al.* (2005) indicaron que en condiciones no reductoras el veneno de *B. asper* presentó las bandas más fuertemente teñidas entre los 16.5 y 25 kDa y en la electroforesis con los venenos de Zacango y Chapultepec las bandas más fuertemente teñidas se encontraron entre 14.4 y 21.5 kDa. Se ha señalado que las diferencias en los patrones electroforéticos de los venenos pueden explicarse en términos de la variabilidad intra-específica en la composición del veneno (Alape-Girón *et al.*, 2008).

Con base en la información anterior y el análisis electroforético de los venenos de *Bothrops asper* (Zacango y Chapultepec) se puede sugerir que en su constitución

están presentes L-aminoácido oxidasas, Metaloproteasa P-III y fosfolipasas A₂ (miotoxina I, II, III, IV); y que estas enzimas le confieren su actividad edematizante. Es relevante indicar que las muestras de veneno de Zacango y Chapultepec también presentaron bandas electroforéticas a los 3.5 y 2.5 kDa. Después de una extensa revisión bibliográfica no se encontraron reportes que indiquen la presencia de bandas similares en el perfil electroforético del veneno de *B. asper* o de especies de la misma familia. Este fenómeno puede tener varias explicaciones: se ha indicado que el veneno representa un atributo trófico adaptativo que permitió a las serpientes la transición de un medio mecánico (constricción) a un medio químico para someter y digerir a las presas (Calvete, 2011); que la composición del veneno y la continuidad de esa composición dependen de la efectividad del veneno en procurar presas. Mínimas variaciones en la composición son toleradas mientras que aquellas que afectan la supervivencia del individuo probablemente se perderán (Chippaux & Goyon, 1991). La explicación va más allá, Moura-da-Silva *et al.* (1995) mencionan que la diversidad de los péptidos del veneno es el resultado directo del modo en que evolucionaron. Los autores indican que los genes que codifican para fosfolipasas A₂ están sujetos a frecuentes eventos de duplicación dentro del genoma de serpientes del género *Bothrops*, lo que resulta en una diversificación acelerada de su función y estructura. En otro estudio, Jiménez *et al.* (2010) reportaron que las secuencias de nucleótidos que codifican las sPLA₂ presentan regiones de alta y baja variabilidad por lo que podrían ser consideradas como cronómetros moleculares para estudiar las relaciones filogenéticas intra-específicas y esto permitiría determinar de manera precisa, la especie de serpiente que ocasiona una mordedura accidental, aspecto que resulta crucial en la elección del suero antiofídico apropiado.

El hecho de que las muestras de veneno de *B. asper* (Zacango y Chapultepec) presentaran diferencias en la intensidad de las bandas puede deberse a que las especies de *Bothrops asper* ordeñadas provenían de 2 regiones geográficas diferentes (Oaxaca y Veracruz), separadas por una cadena montañosa.

Alape-Girón *et al.* (2008) encontraron que el veneno de especímenes adultos y neonatos de *Bothrops asper* de dos poblaciones geográficamente aisladas (vertiente del Caribe y vertiente del Pacífico de Costa Rica) tuvieron diferencias en los perfiles proteicos del veneno entre ambas poblaciones; lo que les llevó a sugerir que las proteínas de los venenos han evolucionado y han tenido mutaciones aceleradas. Esta variabilidad se ha relacionado con las características ambientales del área geográfica donde habitan las serpientes y el tipo de dieta que tienen disponible (Chijiwa *et al.*, 2003; Creer *et al.*, 2003).

Con base en la más completa definición de bandas observadas en la electroforesis donde se corrieron las dos muestras de veneno, se decidió utilizar el veneno de Zacango para realizar los bioensayos: DME y Neutralización del edema por el liofilizado de hojas de *E. americana* (Test de edema plantar); así se realizó la electroforesis del veneno pre-incubado con el liofilizado con la finalidad de conocer si el liofilizado de hojas entre sus mecanismos de acción está inhibiendo al veneno vía degradación proteolítica.

La muestra de suero antiviperino (Antiveneno polivalente Antivipmyn®) usada presentó una banda pronunciada alrededor de los 97.4 hasta los 200 kDa, lo que coincide con Otero *et al.*, (2002) quienes trabajaron con cuatro antivenenos entre ellos el antiveneno polivalente Antivipmyn® con fragmento F(ab')₂ observando una banda en los 100 kDa y bandas con menor intensidad entre los 90 y 100 kDa que corresponden a agregados de proteínas. Por otro lado, la muestra de suero antiviperino presentó una banda a los 66.3 kDa, la cual, según la guía para el control de producción y regulación de inmunoglobulinas antiveneno de la Organización Mundial de la Salud (2010) puede deberse a la presencia de agregados y otros contaminantes de bajo peso molecular que son comunes en los antivenenos que son fragmentados por medio de enzimas.

Por otro lado, al comparar el patrón electroforético del veneno (Zacango) con el patrón electroforético del veneno neutralizado con el liofilizado, se observó que a medida que la proporción de liofilizado se incrementó para neutralizar el veneno,

se presentó una ligera disminución en la intensidad de las bandas de 36.5, 3.5 y 2.5 kDa y a partir de la proporción 1:5 las bandas 3.5 y 2.5 kDa desaparecieron por completo del veneno.

Otros autores ya han reportado los cambios en el patrón electroforético de diversos venenos viperinos por la acción de diferentes extractos de plantas. Núñez *et al.* (2004) encontraron que solo el extracto etanólico del rizoma de *Heliconia curtispatha* indujo cambios notables en el patrón electroforético del veneno de *Bothrops asper*. Patiño *et al.* (2012) detectaron que las fracciones de acetato de etilo y de etanol de *Renalmia alpininia* redujeron la presencia de todas las bandas del veneno de *B. asper*, la fracción de diclorometano redujo bandas en 25 y 48 kDa, mientras que las fracciones de hexano y metanol no mostraron reducción de bandas.

Sin embargo, otros extractos de plantas que empíricamente se recomiendan para tratar accidentes ofídicos no dieron evidencia de degradación proteolítica. Maiorano *et al.* (2005) realizó la electroforesis de veneno de *Bothrops jararacussu* y *Crotalus durissus terrificus* previamente incubado con extractos acuosos de hojas, ramas y raíces de *Mikania glomerata* y no encontraron evidencia de degradación proteolítica. En el análisis electroforético Oliveira *et al.* (2005) tampoco observaron degradación proteolítica de los venenos de *Bothrops jararacussu* y *Crotalus durissus terrificus* y su interacción con el extracto acuoso de las partes aéreas de *Bauhinia forficata*.

Este es el primer reporte de variaciones en el perfil electroforético del veneno de serpientes de *B. asper* en nuestro país como resultado del ensayo de neutralización con el liofilizado de hojas de *E. americana*.

Se ha señalado que las serinoproteasas (31-36 kDa) son las enzimas responsables de la hidrólisis del fibrinógeno (Markland, 1998; Swenson & Markland, 2005), por lo que la disminución en la intensidad de la banda a 36.5 kDa en el perfil electroforético del veneno y su interacción con el liofilizado, podría ser

evidencia de que el liofilizado actúa degradando las serinoproteasas presentes en el veneno; lo que a su vez explicaría la ausencia de sangrado en la lesión en el ensayo del test de edema plantar.

Por otro lado, la notoria desaparición de las bandas de 3.5 y 2.5 kDa a partir de la proporción 1:5 del experimento de neutralización, podría estar relacionada con la actividad anti-edema del liofilizado, sin embargo en la literatura no se encuentran caracterizadas estas bandas protéicas del veneno de *B. asper*, por lo que es necesaria su caracterización.

En la electroforesis también se muestran las bandas generadas cuando el veneno fue pre-incubado con el antiveneno polivalente Antivipmyn®. Estos resultados no pueden discutirse ya que hasta el momento no hay reportes de electroforesis en gel de poliacrilamida que evalúen el cambio proteico del veneno por acción del antiveneno.

Estudios realizados a *Erythrina americana* han sugerido que la fuente de todas sus propiedades curativas son los metabolitos secundarios (Vasconcelos *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Saidu *et al.*, 2000; Miño *et al.*, 2002). Es por esto que al liofilizado de hojas de *Erythrina americana* se le realizaron ensayos químicos. En el análisis preliminar fitoquímico se evidenció que flavonoides, azúcares reductores, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas y glicósidos cardíacos están presentes en el liofilizado. Los datos son consistentes con los hallazgos de otras especies del género. Pino-Rodríguez *et al.* (2004) recabaron información de diversos reportes acerca de los metabolitos secundarios con actividad biológica del género *Erythrina*, en el estudio se menciona que las familias químicas que con mayor frecuencia se reportan son los alcaloides (38%) y los flavonoides (38%). Así, los alcaloides y los flavonoides, representan las familias químicas más relevantes del género *Erythrina*. Araújo-Junior *et al.* (2012), en su trabajo de revisión sobre información fitoquímica de 38 especies del género *Erythrina*, reportaron la ocurrencia de flavonoides en un 29.76%, cumarinas en un 0.09% y alcaloides en un 41.57%.

En otro estudio, el preliminar fitoquímico reveló la presencia de saponinas, compuestos fenólicos, taninos, antraquinonas y flavonoides en el extracto metanólico de flores de *Erythrina suberosa* (Janbaz *et al.*, 2012), mientras que saponinas, alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos se detectaron en los extractos acuoso y metanólico de hojas de *Erythrina indica* (Sakat & Juvekar, 2010). En los resultados del ensayo fitoquímico para *Erythrina senegalensis* DC reportaron que el extracto acuoso de corteza de tallo fue positivo para alcaloides y glicósidos mientras que fue negativo para flavonoides, saponinas, taninos y aceites volátiles (Saidu *et al.*, 2000).

Las similitudes en los metabolitos entre especies del mismo género, en este caso *Erythrina*, se explican porque, como regla, un grupo de metabolito secundario es el que domina dentro de un determinado taxón (Wink, 2003). Estos compuestos químicos se presentan típicamente en sólo una especie o un grupo de plantas taxonómicamente relacionadas (Grabiela-Anca *et al.*, 1997). Ahora bien, las partes de *Erythrina* que fueron utilizadas para los estudios citados incluido el presente, son diferentes lo que explicaría las ligeras discrepancias en metabolitos encontrados, puesto que el patrón de metabolitos secundarios en una planta es complejo; cambia de forma específica en el órgano o tejido; regularmente, estos cambios son notables en diferentes estadios de crecimiento entre individuos y poblaciones, por ejemplo, los órganos que son importantes para la sobrevivencia y la reproducción son los que tiene la mayor cantidad y los más potentes metabolitos (Wink, 2003).

A su vez, muchos factores afectan la síntesis de metabolitos secundarios; la concentración de carbohidratos hidrosolubles, la humedad y la temperatura ambiental son algunos de los más importantes (García, 2004). En esta investigación, la cromatografía en capa fina realizada al liofilizado de hojas reveló la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y taninos. Aun cuando los taninos no fueron cuantificados, no se descarta también su participación en la inhibición de la actividad dañina del veneno, pues se ha reportado la total

neutralización (100%) de la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* con los extractos acuosos y de acetato de etilo de diez plantas en cuyo perfil fitoquímico se encontró la presencia de flavonoides, antocianinas y taninos condensados (Castro *et al.*, 1999). Por otro lado, el primer acercamiento científico hacía un remedio antiofídico natural, en tiempos modernos, fue dirigido a un tanino sacado del fruto inmaduro de *Diospyros kaki*, en Japón. Entre los mecanismos de acción, el papel de los taninos es el más conocido, debido al exhaustivo trabajo de Sheffield sobre la estructura química de la interacción proteína-tanino (Haslam, 1989).

El contenido de flavonoides totales presentes en el liofilizado de hojas de *E. americana* fue de 14.42 mg Quercetina/mL/gExtracto dato que difiere al reportado por Bata en 2014, quien encontró 26.64 y 7.48 mg Rutina/g muestra para el extracto metanólico y acuoso de pétalo de *Erythrina americana*, respectivamente. Estas diferencias en el contenido de flavonoides de *E. americana* pueden explicarse en términos de la variada distribución de los metabolitos a lo largo de la planta. Se ha indicado que los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes internas de la planta y por encima de la superficie del suelo (Martínez-Flórez, 2002).

Con respecto al contenido de flavonoides presentes en *E. americana* y su relación con su actividad antiofídica, ya se ha demostrado que los flavonoides son metabolitos que inhiben la actividad de las fosfolipasas A₂ (Alcaraz & Hoult, 1985), importantes constituyentes de los venenos de serpientes y enzimas a las que se les atribuye la formación del edema y la destrucción del tejido muscular (Montecucco *et al.*, 2008; Dixon & Harris, 1996; Lazarides, 1980; Harris *et al.*, 2003; Gutiérrez & Lomonte, 1995).

El contenido de ácidos fenólicos en el liofilizado de hojas de *E. americana* fue de 25.12 ± 0.24 mg Gal/mL/gExtracto; concentración que coincide con lo reportado por Sakat & Juvekar (2010) quienes detectaron una concentración total de fenoles

de 24.91 ± 0.00 mg Gal/mL/gExtracto en el extracto acuoso de hojas de *Erythrina indica* mientras que en el extracto metanólico fue de 25.62 ± 0.00 mg Gal/mL/gExtracto.

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la biología vegetal; responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. También se incluye su papel de defensa ante la presencia de patógenos y confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización (Mercado-Mercado, 2013).

Ya se ha demostrado que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de formar complejos con metales; además sus grupos hidroxilo, generan puentes de hidrógeno con los aminoácidos presentes en el sitio activo de las fosfolipasas, lo que subsecuentemente lleva a un bloqueo de la acción enzimática (Leanpolchareanchai *et al.*, 2009). Por lo tanto, estos efectos pueden explicar el beneficio que los compuestos fenólicos le pueden conferir al liofilizado de hojas de *E. americana* como antiofídico.

Ya ha sido reportada la actividad antiofídica de algunos de los compuestos fenólicos que se detectaron en el liofilizado cuando se desarrolló la HPLC. Oligómeros del ácido cafeico fueron aislados de dos plantas africanas con reputación de ser usadas como antiofídicos. Los compuestos, así como los monómeros del ácido cafeico probaron su efectividad como antídotos contra el veneno de serpiente administrando por vía oral y parenteral (Agoro, 1978). Otro compuesto que se encontró en el HPLC fue el ácido clorogénico. Se ha reportado que este ácido es capaz de inhibir a la enzima lipooxigenasa (Mors, 2000); por lo que su presencia en el liofilizado puede contribuir a su capacidad anti-inflamatoria. Adicionalmente, la capacidad del ácido cafeico y clorogénico para adherirse a proteínas ha sido investigada a profundidad con albúmina, encontrándose que la interacción es fuerte entre estas moléculas y la albúmina, generando un cambio estructural en la proteína; siendo la interacción del ácido cafeico más fuerte que la del ácido clorogénico (Muralidhara & Prakash, 1995).

Los flavonoides presentes en el liofilizado de hojas de *E. americana* fueron apigenina, rutina, florizidina, mirecetina, quercetina y galanginina. Se ha indicado que los flavonoides son los metabolitos secundarios más versátiles para formar complejos. Estos compuestos tienen vastas posibilidades de formar puentes de hidrógeno, interactuando con blancos moleculares. Sabiendo lo anterior se puede entender que la extraordinaria actividad biodinámica de estos compuestos es una consecuencia directa de su habilidad para adherirse a polímeros biológicos (Mors, 2000). Se ha demostrado que la quercetina es un potente inhibidor de la lipooxigenasa; enzima encargada del metabolismo del ácido araquidónico para formar leucotrienos y lipoxinas (Alcaraz & Hault, 1985).

Grassmann *et al.* (1956) demostró la fuerza de enlace de los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los fenoles de los flavonoides y los grupos amida de las cadenas proteicas. Características que pueden ser la base de su acción terapéutica, debido a que las proteínas (enzimas, transportadores, canales iónicos, receptores, proteínas citoesqueléticas y estructurales) cambian su conformación cuando un complejo fenólico-proteína es formado y como consecuencia la proteína pierde su actividad y función (Wink, 2003). Un estudio de Jin *et al.* (1990) mostró que al determinar la estructura de la rutina utilizando el método de difracción por rayos X, los cuatro grupos hidroxilo libres de la rutina participaban en la formación de puentes de hidrógeno y que, junto al grupo carbonilo del anillo pirona se encontraban fijos y eran capaces de ocupar los sitios activos de un receptor.

Por otro lado, muchos inhibidores sintéticos de metaloproteasas, tales como sales de EDTA y una serie de hidroxamatos basan su mecanismo de acción en la quelación del átomo de zinc requerido para la catálisis (Borkow *et al.* 1997, Bottomley *et al.* 1998). Esta característica quelante es importante ya que el veneno de *Bothrops asper* tiene metaloproteasas con sitio de unión zinc (Bjarnason & Fox, 1994). Principalmente, la afinidad de los flavonoides por los

péptidos, y su capacidad de quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} les confieren la propiedad inhibitoria enzimática.

Algunos de los flavonoides presentes en el liofilizado han sido aislados y se han estudiado sus propiedades antiofídicas, como ejemplo el trabajo de Seba en 1949, que reporta la capacidad de la rutina aplicada junto con un antihistáminico para tratar los efectos vasculares ocasionados por el veneno de *Bothrops atrox*. Vale *et al.* (2011) aislaron cuatro flavonoides (iso-quercitrina, mirecetina-3-O-glucósido, catequina y galocatequina) del extracto acuoso de hojas de *Schizolobium parahyba* probando su actividad hemorrágica y fibrinogenolítica ante el veneno crudo de *Bothrops* y sus metaloproteasas (SVMPs) aisladas encontrando que tanto la galocatequina como mirecetina-3-O-glucósido mostraron ser potentes inhibidores de las SVMPs y los venenos.

A lo largo de los años, las investigaciones nos han permitido dilucidar los componentes de los venenos de las serpientes de importancia médica, es así como se han encontrado diferentes tipos de fosfolipasas (PLA_2) y los esfuerzos se han encaminado a encontrar moléculas selectivas y específicas para los distintos tipos de tóxicas presentes en los venenos. Lindhal & Tagesson (1997) trabajaron con la rutina para evaluar su efecto inhibitorio sobre la fosfolipasa II; además, los investigadores examinaron las similitudes estructurales de los flavonoides que tienen la capacidad de inhibir la fosfolipasa I y II. Los resultados demostraron que la rutina, al igual que la quercetina, son inhibidores selectivos de la fosfolipasa II (>50% de inhibición) pero son inhibidores débiles de fosfolipasa I (40% max de inhibición).

Cuando distintos flavonoides fueron comparados en su habilidad de inhibir PLA_2 , pareciera que pequeños cambios en la estructura del flavonoide van a influenciar la inhibición de la PLA_2 y su selectividad. Se encontró que la quercetina, rutina y quercitrina (inhibidores de PLA_2 -II); tienen grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A y en las posiciones 3' y 4' del anillo B. La remoción o adición de un grupo hidroxilo en el anillo B, como es el caso de la apigenina y miricetina, les

resta selectividad hacia las fosfolipasas II aunque mantiene su potencial inhibitorio (Lindhal & Tagesson, 1997).

Es así que la presencia de grupo hidroxilo en la posición 3' y 4' en el anillo B y en la posición 5 del anillo A, la insaturación de los anillos, y un oxígeno en la posición 4 del anillo C; son importantes y son los que le dan la habilidad a los flavonoides de inhibir la actividad fosfolipasa (Lindhal & Tagesson, 1997).

Posible mecanismo de acción antiedematizante del liofilizado de hojas de *E. americana*

El género *Erythrina* ha sido estudiado con diferentes perspectivas en varias partes del continente americano ya sea por su efecto antiinflamatorio (Vasconcelos *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Saidu *et al.*, 2000; Miño *et al.*, 2002), su efecto antinociceptivo (Miño *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2003; Marchioro *et al.*, 2005) o su efecto analgésico (Saidu *et al.*, 2000). Específicamente, en esta ocasión se informa sobre la habilidad del liofilizado de hojas de *E. americana* para inhibir el edema producido por el veneno de *Bothrops asper*.

Se ha señalado que en los accidentes ofídicos donde se ven involucrados vipéridos, el edema es el resultado de la síntesis de eicosanoides y autacoides, la cual es desencadenada por los componentes enzimáticos del veneno, así como por el daño microvascular debido a la extravasación y liberación de citocinas (Gutiérrez & Lomonte, 2003; Gutiérrez *et al.*, 1984; Gutiérrez & Ownby, 2003). Chaves *et al.*, (1995) demostraron que el pretratamiento con indometacina (inhibidor de la vía ciclooxigenasa), dexametasona y mepacrina (dos drogas inhibitoras de las fosfolipasas A₂ vía dos diferentes mecanismos), redujeron el edema plantar inducido por el veneno de *Bothrops asper*. Los autores concluyen que el proceso inflamatorio se encuentra mediado, al menos en parte, por la actividad de las fosfolipasas A₂ y de productos eicosanoides sintetizados a partir de las ciclooxigenasas.

En otra investigación, Pillay *et al.* (2001) informaron además de la actividad antibacteriana, que los extractos etanólico y de acetato de etilo de hojas y tallos de cinco especies de *Erythrina* inhibieron la actividad de la ciclooxigenasa. Asimismo, Hedge *et al.* (1997) reportó que tres flavonoides (abyssinone V, erycrystagallini y la isoflavona 4'-hidroxy-6,3',5'-triprenylisoflavonone) aislados del extracto metanólico de tallo de *Erythrina variegata* fueron eficaces para inhibir la actividad de las fosfolipasas A₂.

Sin lugar a duda, los flavonoides presentes en *E. americana* están relacionados con la actividad antiofídica del liofilizado pues ya se ha demostrado que los flavonoides son metabolitos que inhiben la actividad de las fosfolipasas A₂ y no se escapa la posibilidad de que también estén actuando vía la inhibición de enzimas responsables de la inflamación como es el caso de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (Alcaraz & Hoult, 1985).

Con base en la literatura, los bioensayos, el perfil electroforético del veneno y el trabajo fitoquímico practicado al liofilizado de hojas de *Erythrina americana* hay evidencia suficiente para explicar su actividad antiedema a dos niveles. Es probable que el liofilizado inhibiera la actividad de las fosfolipasas, metaloproteasas y serinoproteasas, enzimas inflamatorias presentes en el veneno de *B. asper* y paralelamente inhibiera a las lipooxigenasas y ciclooxigenasas, enzimas que se producen como resultado del propio mecanismo de defensa del organismo ante la agresión física y química.

La relevancia de este estudio radica en que es el primer trabajo que aporta evidencia experimental que sustenta el uso, que comunidades de nuestro país, le dan a *Erythrina americana* para atender los accidentes ofídicos.

Es importante precisar que estos resultados no sugieren que se deba erradicar el uso del suero antiofídico, sino que, citando a Patiño *et al.* (2012), representan la base para la búsqueda de nuevas estrategias que coadyuven a disminuir los efectos tóxicos de los venenos de las serpientes, durante el traslado del paciente a

un centro de salud y a su vez, sustentan que recurriendo a las plantas, de una forma adecuada, es probable disminuir las secuelas del accidente ofídico tales como las amputaciones e incluso las muertes que actualmente se producen.

IX. CONCLUSIONES

- Los resultados muestran que 10 y 15 μg de liofilizado de hojas de *Erythrina americana* neutralizaron el efecto inflamatorio del veneno de *Bothrops asper*.
- Los cambios que el liofilizado de *Erythrina americana* indujo en el patrón electroforético del veneno de *Bothrops asper* sugiere que la hidrólisis de proteínas es un mecanismo potencial.
- Entre los compuestos responsables de la neutralización del veneno se propone a los flavonoides (apigenina, rutina, mirecetina y quercetina) y ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido clorogénico) presentes en el liofilizado de *Erythrina americana*.
- El liofilizado no presentó toxicidad aguda y esto respalda el uso étnico que se le da al extracto acuoso de las hojas de *Erythrina americana* para atender diversos padecimientos, incluidos los accidentes ofídicos, sin poner en riesgo la salud humana.

X. PERSPECTIVAS

- Debido a que la evolución del accidente ofídico va acompañado de hemorragia y necrosis muscular, es importante determinar si estos fenómenos también se ven detenidos por la acción del liofilizado de hojas de *Erythrina americana*.
- Con el fin de incursionar en el mecanismo de acción, es conveniente caracterizar las proteínas del veneno (bandas 3.5-2.5 kDa) que en el patrón electroforético se vieron afectadas por la acción del liofilizado.

XI. GLOSARIO

- **Analgesia:** Alivio del dolor. Ausencia de la sensación de dolor.
- **Antígeno:** Sustancia que tiene inmunogenicidad (capacidad de provocar una respuesta inmunitaria) y reactividad (capacidad de reaccionar con anticuerpos o células originados durante la respuesta inmunitaria).
- **Apoptosis:** Muerte celular programada; tipo normal de muerte celular que elimina las células innecesarias durante el desarrollo embrionario, regula el número de células en los tejidos y elimina aquellas potencialmente peligrosas como las cancerosas. Durante la apoptosis el DNA se fragmenta, el núcleo se condensa, las mitocondrias dejan de funcionar y el citoplasma se encoge, pero la membrana plasmática permanece intacta. Los fagocitos engloban y digieren a las células apoptóticas sin que haya una respuesta inflamatoria.
- **Broncoespasmo:** Es una manifestación de la hiperreactividad bronquial frente a determinados estímulos físicos, químicos, inmunológicos, neurógenos, etc. Es el estrechamiento de la luz bronquial como consecuencia de la contracción de la musculatura de los bronquios, lo que causa dificultades al respirar.
- **Buffer (solución amortiguadora):** Solución de un ácido débil y su base conjugada en cantidades aproximadamente iguales. Atenúa los cambios del pH frente al agregado de un ácido o una base.
- **Coagulación:** Se denomina coagulación al proceso de formación de una placa de células sanguíneas (coágulo) para evitar la pérdida de sangre cuando se rompe un vaso sanguíneo.
- **Densidades flocculantes:** Sustancia orgánica que aglutina sólidos en suspensión provocando su precipitación.
- **Dolor:** Mecanismo esencial de señal temprana que nos alerta de la presencia de estímulos lesivos, se inicia en las fibras sensoriales nociceptoras especializadas de los tejidos periféricos.

- **Dominio:** Región de una proteína con interés biológico funcional o estructural. Zona de mayor densidad, hay más plegamientos.
- **Edema:** Acumulación anormal de líquido intersticial.
- **Electroforesis en gel:** Procedimiento en el que las macromoléculas son separadas sobre la base de su carga o su tamaño por su migración diferencial a través de una matriz similar a un gel bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) la matriz es poliacrilamida entrecruzada.
- **Enzima:** Sustancia que acelera las reacciones químicas; catalizador orgánico, generalmente una proteína.
- **Equimosis:** Lesión subcutánea caracterizada por depósitos de sangre debajo de la piel (hematoma).
- **Falla renal aguda (FRA):** Denominada también insuficiencia renal aguda es un síndrome clínico caracterizado por una disminución brusca de la función renal
- **Fascículo:** Pequeño haz, en especial de nervios o fibras musculares.
- **Fosorial:** Organismo adaptado a excavar agujeros dentro del sustrato.
- **Hemorragia:** Sangrado; salida de sangre de los vasos sanguíneos, en especial cuando la pérdida de sangre es profusa.
- **Hiperalgnesia:** Es un estado de sensibilidad aumentada al dolor, que ocurre después de una lesión y puede persistir de forma crónica.
- **Hipotensión:** Condición anormal en la que la presión sanguínea de un individuo es más baja de lo usual, lo que provoca síntomas como vértigo o mareo.
- **Inmunoglobulina:** Anticuerpo sintetizado por las células plasmáticas derivadas de linfocitos B en respuesta a la introducción de un antígeno. Las inmunoglobinas se dividen en cinco tipos (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE).
- **Isquemia:** Estrés celular causado por cualquier disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno (hipoxia), de nutrientes y la eliminación de productos del

metabolismo de un tejido biológico. Este sufrimiento celular puede ser suficientemente intenso como para causar la muerte celular (necrosis).

- **Necrosis:** Tipo de muerte celular patológica ocasionada por una enfermedad, lesiones o falta de irrigación en el cual muchas células adyacentes se hinchan, estallan y derraman su contenido en el líquido intersticial para desencadenar una respuesta inflamatorio.
- **Paro cardíaco:** Es la detención de la respiración y del latido cardíaco en un individuo.
- **Picnosis:** Es la retracción del núcleo, condensación de la cromatina
- **Plaqueta:** Fragmento de citoplasma encerrado en una membrana celular carente de núcleo. Se encuentra en la sangre circulante e interviene en la hemostasia. También llamado trombocito.
- **Síndrome compartimental:** Es una afección que implica aumento de la presión en un compartimento muscular. Puede llevar a daño en nervios y músculos, al igual que problemas con el flujo sanguíneo.
- **Suero:** Plasma sanguíneo sin las proteínas de la coagulación.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agoro, J.W. (1978). Crystalline caffeic acid derivatives and compositions and method for treating snakebite. US Patent, 4,124,724 [*Chem Abstr*, 90, 103649f (1979)].
- Alam, M.I. & Gomes, A. (2003). Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Embllica officinalis*) root extracts. *J Ethnopharmacol*, 86, 75-80.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M. & Calvete, J.J. (2008). Snake venomomics of the lacehead viper *Bothrops asper*: geographic, individual and ontogenetic variations. *J Proteom Res*, 7, 3556-3571.
- Alcaraz, M.J. & Hault, J.R.S. (1985). Effect of hypolactin-8-glucoside and related flavonoids on soybean lipoxygenase and snake venom phospholipase A₂. *Archives of Internal Medicine*, 278, 4-12.
- Angulo, Y. & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54, 949-957.
- Araújo-Júnior, J., De Oliveira, M., Aquino, P., Alexandre-Moreira, M. & Sant'Ana, A. (2012). *A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus Erythrina*. Universidade Federal de Alagoas, Brazil.
- Argueta, A., Cano, L. & Rodarte, M. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana I*. 1ª Edición, Biblioteca de la medicina tradicional Mexicana. pp. 495.

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Besson, J.M. (1999). The neurobiology of pain. *Lancet*, 353, 1610 – 1615.
- Bieber, A. L. & Nedelhov, D. (1997). Structural, biological and biochemical studies of myotoxin α and homologous myotoxins. *J Toxicol Toxin Rev*, 16, 33–52.
- Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacological Therapy*, 62, 325-372.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W. (1995). Snake venom metalloproteinases: reprotlysins. *Methods Enzymol*, 248, 345–368.
- Bolaños, R. (1982). Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos sologicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev Cost Cienc Méd*, 3, 165-184.
- Borkow, G., Gutiérrez, J.M. & Ovadia, M. (1993). Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 31, 1137–1150.
- Borkow, G., Gutiérrez, J.M. & Ovadia, M. (1997). Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. *Toxicon*, 35, 865-877.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Andriao-Escarso, S.H., Diniz, H., Hamaguchi, A., Quintero, A., Lizano, S., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. & Homs-Brandeburgo, M.I. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comp Biochem Physiol*, 127, 21–30.
- Bottomley, K.M., Johnson, W.H. & Walter, D.S. (1998). Matrix metalloproteinase inhibitors in arthritis. *J Enzyme Inhibition*, 13, 79-101.
- Busch, S.P., Hegewald, K.G., Green, S.M., Cardwell, M.D. & Hayes, W.K. (2000). Effects of a negative pressure venom extraction device (Extractor) on local tissue injury after artificial rattlesnake envenomation in a porcine model. *Wilderness Environ Med*, 11, 180–188.
- Calvete, J. (2011). Proteomics in venom research: a focus on PLA₂ molecules. *Acta Chim Slov*, 58, 629-637.
- Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Castro, O., Gutiérrez, J.M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M. & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bohtrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev Biol Trop*, 47 (3), 605-616.
- Chacur, M., Longo, I., Picolo, G., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Guerra, J.L., Teixeira, C.F.P., Cury, Y. (2003). Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, 41, 667– 678.
- Chacur, M., Gutierrez, J.M., Milligan, E.D., Wieseler-Frank, J., Britto, L.R.G., Maier, S.F., Watkins, L.R. & Cury, Y. (2004). Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. *Pain*, 111, 65–76.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Cherng, J. (2002). Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 10, 176-182.
- 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 (1), 31-39.

- Chijiwa, T., Yamaguchi, Y., Ogawa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakashima, K., Oda-Ueda, N., Fukumaki, Y., Hattori, S. & Ohno, M. (2003). Interisland evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom phospholipase A₂ isozymes. *J Mol Evol*, 56, 286–293.
- Chippaux, J.P. & Goyon, M. (1991) Production and use of snake antivenin. *Reptile Venoms and Toxins*, 5, 529-555.
- Creer, S., Malhotra, A., Thorpe, R.S., Stöcklin, R., Favreau, P. & Chou, W. H. (2003). Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pitviper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. *J Mol Evol*, 56, 317–329.
- Cundall, D. & Greene, H.W. (2000). Feeding in snakes. En K. Schwenk (Ed.), *Feeding, form, function, and evolution in tetrapod vertebrates* (pp. 293–333). San Diego: Academic Press.
- De Roodt, A.R., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solís, J.F., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J.A., Robles-Ortiz, L.E. & Alagón, A. (2005). Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac Méd Méx*, 141 (1), 13-21.
- Devor, M. (1994). The pathophysiology of damaged peripheral nerves. En: P.D Wall, R. Melzack (Eds.), *Textbook of Pain* (pp. 79–100). Churchill Livingstone, London.
- Díaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F. & Gutiérrez, J.M. (1995). Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. *Nat Toxins*, 3 (1), 26-31.
- Dickenson, A.H. & Sullivan, A.F. (1987). Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology*, 26, 1235–1238.
- Dixon, R.W. & Harris, J.B. (1996). Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 1230–1237.
- Dray, A., (1997). *The pharmacology of pain*. En: Dickenson, A., Besson, J.M. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin, pp. 21–41.
- Duque-Zerpa, C.T., Fernández, I., Vargas, A., López-Johnsthor, J.C. & Scannone, T.H. (2014). Caracterización toxicológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. *Revista Científica*, XXIV (4), 355-362.
- Félix-Silva, J., Souza, T., Menezes, Y.A.S., Cabral, B., Câmara, R.B.G., Silva-Junior, A.A., Rocha, H.A.O., Rebecchi, I.M.M., Zucolotto, S.M., Fernandes-Pedrosa, M.F. (2014). Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. *PLoS ONE*, 9 (8), e104952.
- Félix-Silva, J., Gomes, J.A.S., Xavier-Santos, J.B., Passos, J.G.R., Silva-Junior, A.A., Tambourgi, D.V. & Fernandes-Pedrosa, M.F. (2017). Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon*, 125, 74-83.
- Fox, J. W., Elzinga, M. & Tu, A. T. (1979). Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin a isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry* 18, 678-684.
- Fox, J.W. & Long, C. (1998). *The ADAMs/MDC family of proteins and their relationships to the snake venom metalloproteinases*. En: Bailey, G. (Ed.), *Snake Venom*
-

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Enzymes. Alaken Press, Ft Collins, CO, pp. 151–187.
- Fox, J.W. & Serrano, S. (2005). Structural considerations of the snake metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of the metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.
- García, D.E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27 (1), 1-12.
- Garrido, A. (1997). *Etnografía y análisis del uso de plantas medicinales de ocho comunidades mestizas del municipio de Catemaco, Veracruz*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa.
- Gibbs, H. L. & Rossiter, W. (2008). Rapid evolution by positive selection and gene gain and loss: PLA₂ venom genes in closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *J Mol Evol*, 66, 151–166.
- Grabiela-Anca, C., Dean, K. & Wiley, D. (1997). Phytoestrogens and floral development in dioecious *Maclura pomifera* (Raf.) Schoneid. and *Morus rubra* (L.) (*Moraceae*). *Plant Science*, 130, 27.
- Grassmann, W., Hormann, H. & Hartl, A. (1956). Chromatography of phenols on polyamides. *Makromolekulare Chemie*, 21, 37-49.
- Gomes, A., Das, R., Sarkhel, S., Mishra, R., Mukherjee, S., Bhattacharya, S. & Gomes, A. (2010). Herbs and Herbal constituents active against snake bite. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 865-878.
- Gutiérrez, J.M., Chaves, F., & Bolaños, R. (1980) Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev Biol Trop*, 28, 341-351.
- Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O. & Portilla, E. (1981). Neutralization de los efectos locales de1 veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon*, 19, 493–500.
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A. & Cerdas, L. (1986) Comparative study of edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85C, 171-175.
- Gutiérrez, J.M. & Lomonte, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33, 1405–1424.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (2003). Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. En Cardoso, J. L. C., Franca, F. O. S, Wen, F. H., Málaque, C. M. S. & Haddad, V (Eds.), *Animais Peconhentos no Brasil* (pp. 310–323). Biología, Clínica e Terapeutica Sao Paulo: Sarvier.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. & Odell, G.V. (1984). Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Expl molec Path*, 40, 367-379.
- Gutiérrez, J.M. & Ownby, C. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42, 915-931.
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D.G. & Warrell, D.A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Med*, 3, e150.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W. & Warrell, D.A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56, 1223–1235.
- Hardy, D.L. (1994). *Bothrops asper* (Viperidae) snakebite and field researchers in Middle

- America. *Biotropica*, 26, 198–207.
- Hardy, D.L. (2003). Alternatives in the field management of venomous snakebite. En: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Fan, H.W., Málaque, C.M.S. A., Hadad Jr., V. (Eds.), *Alternatives in the field management of venomous snakebite. Animais peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapeutica dos Acidentes* (pp. 402–416). Sarvier/FAPESP, Sao Paulo.
- Harris, J.B., Vater, R., Wilson, M. & Cullen, M.J. (2003). Muscle fibre breakdown in venom-induced muscle degeneration. *J Anat*, 202, 363–372.
- Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable tannins) as drugs: posible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.
- Hedge, V.R., Dai, P., Patel, M.G., Puar, M.S., Das, P., Pai, J., Bryant, R. & Cox, P.A. (1997). Phospholipase A₂ inhibitors from an *Erythrina* species from Samoa. *J of Natural Products*, 60 (6), 537-539.
- Hodge, A. and Sterner, B. (2005) .*Toxicity classes*. En: Canadian center for occupational Health and safety. Copy right @1997-2010. Disponible en: <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>.
- Holguin, A., O'Connor, K.A., Hansen, M.K., Milligan, E.D., Cheepsunthorn, P., Bravmann, C., Cochran, K., Biedenkapp, J., Martin, D., Maier, S.F. & Watkins, L.R. (2002). Nitric oxide mediates HIV-1 gp120-induced spinal proinflammatory cytokine production and low threshold mechanical allodynia. *J Pain Suppl*, 2, 279-313.
- Huatuco S., Escobar, E. & Yarlequé, A. (2004). Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). *Rev Peru Biol*, 11(1), 79- 86.
- Instituto de Biología. (2017). *Erythrina americana* Miller (en línea). Disponible en: <http://unibio.ibiologia.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn12112>
- Janbaz, K.H., Nisar, U., Ashraf, M. & Qadir, M.I. (2012). Spasmolytic, bronchodilatory and antioxidant activities of *Erythrina superosa* Roxb. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69 (6), 1111-1117.
- Jia, L.G., Wang, X.L., Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (2000). Function of the cysteine-rich domain of the hemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: collagen targeting and inhibition of platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys*, 373, 281–286.
- Jiménez, K., Zavaleta, A., Izaguirre, V., Yarleque, A. & Inga, R. (2010). Clonaje y caracterización molecular *in silico* de un transcrito de fosfolipasa A₂ aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 27 (4), 532-539.
- Jin, G-Z., Yamagata, Y. & Tomita, K-I. (1990). Structure of rutin pentamethanol. *Chem Pharm Bull*, 38 (2), 297-300.
- Kadir, M.F., Karmoker, J.R., Alam, R., Jahan, S.R., Mahbub, S. & Mia, M.M.K. (2015). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers and indigenous people in Chittagong Hill Tracts, Bangladesh, for the treatment of snakebite. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Kaiser, L.I., Gutiérrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D. & Odell, G.V. (1990). The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys*, 278, 319–325.
- Kennedy, G.L., Ferenz, R.L. & Burgess, B.A. (1986). Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. *Journal of applied toxicology*, 6 (3), 145-148.
- Kidd, B.L. & Urban, L.A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*, 87, 3–

- 11.
- Klauber, L.M. (1956). *Rattlesnakes: their habits, life histories, and influence on mankind*. USA: University of California Press.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. & Mitchell, R. (2008). *Patología humana* (8ª Ed.). España: Elsevier.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laure, C. J. (1975). Die Primärstruktur des Crotamins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 356, 213-215.
- Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283, 249–256.
- Lazo, F., Málaga, O., Yarlequé, A. & Severino, R. (2007). Algunas propiedades bioquímicas de una L-aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev Soc Quim Perú*, 73 (3), 131- 141.
- Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., Bavovada, R. & Saparpakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai mango seed kernel extract against snake venoms. *Molecules*, 14, 1404–1422.
- Lindahl & Tagesson. (1997). Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitor: Importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. *Inflammation*, 21 (3), 347-356.
- Lizano, S., Domont, G. & Perales, J. (2003). Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*, 42, 963-977.
- Luna-Bauza, M. (2007). Bases para el tratamiento por intoxicación por veneno de serpiente. *Rev Fac Med*, 50 (5), 199-203.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2012). *Biología Celular y Molecular*. 5a Edición. Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 155-163.
- Lomonte, B. & Carmona, E. (1992). Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol*, 102, 325–329.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, 27, 725–733.
- Lomonte B, Tarkowski, A. & Hanson, HA. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom: Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in mouse model. *Inflammation*, 17, 95-105.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol*, 54 (4), 275-87.
- Mackessy, S.P. (Ed.). (2010). *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press: Taylor & Francis group.
- Mahadeswaraswamy, Y.H., Devaraja, S., Kumar, M.S., Goutham, Y.N.J. & Kemparaju, K. (2009). Inhibition of local effects of Indian *Daboia/Vipera russelli* venom by the methanolic extract of grape (*Vitis vinífera L.*) seeds. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 46, 154-160.
- Maiorano, V.A., Marcussi, S., Daher, M.A.F., Oliveira, C.Z., Couto, L.B., Gomes, O.A., França, S.C., Soares, A.M. & Pereira, P.S. (2005). Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 364-370.
- McMahon, S.B., Cafferty, W.B. & Marchand, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol*, 192, 444–462.

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Marchioro, M., Arrigoni, M.F., Veras, R.H. & Antonioli, A. (2005). Anti-nociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. *Fitoterapia*, 76, 637-642.
- Markland, F. S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36, 1749–1800.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. & Tuñón, Ma. J. (2002). Flavonoids: Properties and antioxidizing action. *Nutrición Hospitalaria*, 17, 271-278.
- Matzner, O., Devor, M. (1994). Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J Neurophysiol*, 72, 349–359.
- Mebs, D. & Ownby, C.L. (1990). Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac Ther*, 48, 223–236.
- Meenatchisundaram, S., Priyagrace, S., Vijayaraghavan, R., Velmurugan, A., Parameswari, G. & Michael, A. (2009). Antitoxin activity of *Mimosa pudica* root extracts against *Naja naja* and *Bangarus caeruleus* venoms. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 4, 105-109.
- Meenatchisundaram, S. & Sindhu, M. (2011). *In vivo* and *in vitro* studies on neutralizing effects of *Acorus calamus* and *Withania somnifera* root extracts against *Echis carinatus* venom. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 10, 26-30.
- Mercado-Mercado, G., De la Rosa Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López-Díaz, J.A. & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Polyphenolic compounds and antioxidant capacity of typically consumed species in Mexico. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 36-46.
- Milani, R., Jorge, M.T., Ferraz de Campos, F.P., Martins, F.P., Bousso, A., Cardoso, J.L.C., Ribeiro, L.A., Fan, H.W., Franca, F.O.S., Sano-Martins, I.S., Cardoso, D., Fernandez, I.C.O.F., Fernandes, J.C., Aldred, V.L., Sandoval, M.P., Puerto, G., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A. (1997). Snake bites by the jararacucu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State. *Braz. Q J Med*, 90, 323-334.
- Miño, J., Gorzalczy, S., Moscatelli, V., Ferraro, G., Acevedo, C. & Hnatyszyn, O. (2002). Actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. *Acta Farm Bonaerense*, 21 (2), 93-8.
- Montecucco, C., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (2008). Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2897-2912.
- Moreira, V., Gutiérrez, J.M., Soares, A.M., Zamunér, S.R., Purgatto, E., Teixeira, C.F.P. (2008). Secretory phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E₍₂₎ and D₍₂₎ and expression of cyclooxygenases. *Toxicon*, 52, 428–439.
- Mors, W.B., Nascimento, M.C., Pereira, B.M. & Pereira, N.A. (2000). Plant natural products active against snake bite the molecular approach. *Phytochem*, 55, 627–642.
- Moura-da-Silva, A.M., Della-Casa, M.S., David, A.S., Assakura, M.T., Butera, D., Lebrun, I., Shannon, J.D., Serrano, S.M.T. & Fox, J.W. (2003). Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch Biochem Biophys*, 409, 395–401.
- Muralidhara, B.K. & Prakash, V. (1995). Interaction of 3H-O-caeoyl-d-quinic acid with human serum albumin. *Int J Peptide Protein Res*, 46, 1-8.
- Neri-Castro, E., Bénard, M. & Alagón, A. (2014). Reptiles venenosos en México. *Revista UNAM*, 15, (11).

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Ovadia, M., Moussatché, H. & Domont, G.B. (1996). Inhibitory properties of the antiothropic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon*, 35, 849–863.
- Neves-Ferreira, A.G.C., Cardinale, N., Rocha, S.L.G., Perales, J. & Domont, G.B. (2000). Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim Biophys Acta*, 1474, 309–320.
- Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R.G., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Díaz, A. & Quintana, J.C. (2004). Neutralization of the edema forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 969-977.
- Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T. & Hattori, S. (2003). Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. *Toxicon*, 42 (8), 841-854.
- Oliveira, C.Z., Maiorano, V.A., Marcussi, S., Sant'Ana, C.D., Januário, A.H., Lourenço, M.V., Sampaio, S.V., França, S.C., Pereira, P.S. & Soares, A.M. (2005). Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 213-216.
- Oliveira, M.S., Aquino, A., Silva, D. Aquino, P., Santos, M., Porfirio, A., Sant' Ana, A., Santos, B., Alexandre-Moreira, M. & Araújo-Júnior, J. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. *Bras J Pharm*, 22 (1), 157-161.
- Olivo, A., Teixeira, C.F.P., Wallace, J.L., Gutiérrez, J.M. & Zamuner, S.R. (2007). Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*, 49, 670–677.
- Ortiz, C., Lazo, F., Bellido, C., Gonzales, E. & Yarlequé, A. (2012). Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpientes *Bothrops atrox* “Jergón”, de tres zonas geográficas del Perú. *Rev peru med exp Salud Publica*, 29 (2), 198-205.
- Otero, R. (1994). *Manual de Diagnóstico y Tratamiento del Accidente Ofídico*. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín.
- Otero-Patiño, R., Cardoso, J.L.C., Higashi, H.G., Nunez, V., Díaz, A., Toro, M.F., García, M.E., Sierra, A., García, L.F., Moreno, A.M., Medina, M.C., Castañeda, N., Silva-Díaz, J.F., Murcia, M., Cardenas, S.Y., Dias da Silva, W.D. & The regional group on antivenom therapy research (REGATHER). (1998). A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 58 (2), 183-189.
- 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. *Revista Colombiana de Medicina y Salud Pública*, 15, 5–15.
- Otero, R. (2002). Seroterapia antivenenosa. Ventajas del uso de anti-venenos del tipo IgG, F(ab')₂ o Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. *Pediatría*, 37, 8–16.
- Otero, R. (2007). Envenenamiento ofídico. En Correa, J.A., Gómez, J.F., Posada, R. (Eds.), *Fundamentos de Pediatría (Tomo V)*. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín.

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Owuor, B.O., Mulemi, B.A. & Kokwaro, J.O. (2005). Indigenous snake bite remedies of the Luo of western Kenya. *Journal of Ethnobiology*, 25 (1), 129-141.
- Patiño, A.C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J.C. & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (*Zingiberaceae*) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, 32, 365-374.
- Picado, C. (1931). *Serpientes Venenosas de Costa Rica. Sus Venenos*. Seroterapia Antiofídica. Imprenta Alsina, San José.
- Pillay, C., Jäger, A., Mulholland, D. & van Staden, J. (2001). Cyclooxygenase inhibiting and anti-bacterial activities of South African *Erythrina* species. *J of Ethnopharmacology*, 74, 231-237.
- Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M.E. & Molina-Torres, J. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farm Bonaerense*, 23 (2), 252-258.
- Ramos-Cerrillo, B., De Roodt, A.R., Chippaux, J-P., Olguín, L., Casasola, A., Guzmán, G., Paniagua-Solís, J., Alagón, A. & Stock, R.P. (2008). Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon article in press*, 1-8.
- Ramos-Hernández, M., Avila, C. & Morales, J. (2007). Etnobotánica y ecología de plantas utilizadas por tres curanderos contra la mordedura de serpiente en la región de Acayucan, Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81, 89-100.
- Riedel, W. & Neeck, G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *J Rheumatol*, 60, 404-415.
- Rosenfeld, G. (1971). *Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America*. En: Bücherl, W., Buckley, E.E. (Eds.), *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press, New York, pp. 345-384.
- Murphy, S.H. (2012). Inflamación. En R. Rubin & D. Strayer (Eds.), *Patología: Fundamentos clinicopatológicos en medicina* (6ª Edición, pp. 47-82). Barcelona, España: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins,.
- Saidu, K., Onah, J., Orisadipe, A., Olusola, A., Wambebe, C. & Gamaniel, K. (2000). Antiplasmodial, analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 275-280.
- Sakat, S. & Juvekar, A. (2010). Comparative study of *Erythrina indica* Lam. (Fabaceae) leaves extracts for antioxidant activity. *J Young Pharm*, 2, 63-67.
- Sandoval, G.A., Mendoza, J., Roldán, W., Espinoza, Y., Solís, H. & Yalerqué, A. (2011). Inmunogenicidad del veneno de *Bothrops atrox* (Ophidia:Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos. *Rev peru boil*, 18 (3), 335-341.
- Saravia-Otten, P., Frisan, T., Thelestam, M., & Gutiérrez, J.M. (2004). Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. *Toxicon*, 44, 749-764.
- Savage, J. M. (2002). *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between two continents, between Two Seas*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Sawai, Y. (1980). Studies on snakebites in the Asian areas. En: Eaker, D., Wadstrom, T. (Eds.), *Natural Toxins* (pp. 25-32). Pergamon Press, Oxford.
- Schaible, H.G. & Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg*, 389, 237-243.

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Sherwood, E.R. & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18, 385–405.
- Seba, R.A. (1949). Efectos vasculares del veneno de *Bothrops atrox*: sua pela rutina e um anti-histaminico. *Revista Fluminense de Medicina*, 14, 186-189.
- Solórzano, A. (2004). *Serpientes de Costa Rica: Distribución, Taxonomía e Historia. Natural/Snakes of Costa Rica: Distribution, Taxonomy, and Natural History*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Editorial INBio.
- Sotolongo, M (1988). *Elementos de Toxicología*. Editorial Pueblo y Educacion, Ciudad de La Habana, Cuba.
- Standley, C.P. & Steyermark, A.J. (1946). Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany V 24 parte V. Published Chicago Natural History Museum.
- Swenson, S. & Markland Jr, F.S. (2005). Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*, 45, 1021-1039.
- Thwin, M.M. & Gopalakrishnakone, P. (1998). Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991–1997). *Toxicon*, 36, 1471–1482.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G. & Chaves, F. (2009). Inflammation induced by *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54, 988-997.
- Umaña, V. (1982). Purificación y separación de isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper*. *Rev Biol Trop*, 30, 59-64.
- Vale, L.H., Mendes, M.M., Fernandes, R.S., Costa, T.R., Hage-Melim, L.I., Sousa, M., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Franca, S.C., Silva, C.H., Pereira, P.S., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. (2011). Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. *Curr Top Med Chem*, 11 (20), 2566-2577.
- Valencia, D.T.G. & Garin, A.M.E. (2010). *Manual de prácticas de productos naturales*. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología.
- Vasconcelos S.M.M., Oliveira G.R. & Carvalho M.M. (2003). Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extract from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 946-949.
- Vidal, N. & David, P. (2004). New insights into the early history of snakes inferred from two nuclear genes. *Mol Phyl Evol*, 31, 783–787.
- Vidal, N. & Hedges, S.B. (2002). Higher-level relationships of snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. *Comp Rend Biol*, 325, 977–985.
- Vonk, F. J., Admiraal, J.F., Jackson, K., Reshef, R., de Bakker, M.A., Vanderschoot, K., van den Berge, I., van Atten, M., Burgerhout, E., Beck, A., Mirtschin, P.J., Kochva, E., Witte, F., Fry, B.G., Woods, A.E. & Richardson, M.K. (2008). Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*, 454, 630–633.
- Warrell, D.A. (2004). *Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America*. En: Campbell, J., Lamar, W. W. (Eds.), *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, 709–761.
- Watkins, L.R., Wieseler-Frank, J., Milligan, E.D., Johnston, I., Maier, S.F. (2006). Contribution of glia to pain processing in health and disease. En: F Cervero, T.S. Jensen (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology. Pain* (pp. 309–323). Elsevier B.V, London, UK.
- Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Black, J.A. (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol*, 72, 466–470.

Efecto del liofilizado de hojas de *Erythrina americana* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* (Nauyaca)

- Wieseler-Frank, J., Maier, S.F. & Watkins, L.R. (2004). Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int*, 45, 389–395.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- Woolf, C.J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306, 686–688.
- Woolf, C.J. & Wall, P.D. (1986). Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci*, 6, 1433 – 1442.
- Organización Mundial de la Salud (2010). *WHO guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins*. Switzerland.
- Yamakawa, M., Nozaky, M., Hokama, Z. (1976). Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. *Toxins: Animal, plant and microbial*, 97-109.
- 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 adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*, 46, 806–813.
- Zuñiga, I & Caro, J. (2013). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 6 (4), 125-136.