



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**“EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE ESPECIES  
VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA  
TRADICIONAL MEXICANA CONTRA LA PICADURA DE  
ALACRAN”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas**

**PRESENTA**

**M. en C. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER**

**Director de Tesis: Dr. Rubén Román Ramos  
Co Director de Tesis: Dr. Jaime Tortoriello  
Asesor: Dr. Héctor Ponce Monter**

**Abril del 2004**

El presente trabajo de investigación se realizó en:

EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL SUR, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

Proyecto financiado por Fondo de Fomento para la investigación de la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (**FOFOI, FP-2001/031**) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

**Comité revisor**

**Dra. Mariana Meckes Fischer**

**Dr. Rubén Román Ramos**

**Dr. Jaime Tortoriello García**

**Dr. Héctor Ponce Monter**

**Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

*A: Adi, Emely e Itzia*

Quiero agradecer cumplidamente a:

Dr. Rubén Román Ramos, por apoyar éste proyecto ante la Universidad Autónoma Metropolitana.

Dr. Jaime Tortoriello, por procurar el espacio académico y físico para mi desarrollo profesional, asimismo por su dirección.

Dr. Héctor Ponce Monter por su asesoramiento a lo largo del desarrollo del proyecto.

Dra. Mariana Meckes Fischer y al Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar, por sus importantes aportaciones al proceso de escritura de esta Tesis.

M. en C. Maribel Lucila Herrera Ruiz, por su comprometido apoyo en cada una de las etapas del proceso de formación.

M. en C. Yolanda Yamila Pérez Terán, por sus valiosas críticas.

M. en C. Guillermo Julio Ramírez Ávila, por sus valiosas enseñanzas con las que me ha distinguido.

## INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Antecedentes	7
El alacranismo en México	7
Fisiopatología de la intoxicación por picadura de alacrán	10
Toxinas del veneno de alacrán.	12
Efecto del veneno sobre el páncreas	17
Efectos del veneno de alacrán sobre el sistema cardiovascular.	19
Antecedentes Etnobotánicos, Farmacológicos y Químicos de la <i>Aristolochia elegans</i> y de la <i>Bouvardia ternifolia</i> .	21
Justificación y planteamiento del problema	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Material y métodos	26
Material vegetal	26
Preparación de los extractos	26
Preparación de veneno de alacrán de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> .	26
Animales de experimentación	27
Pruebas de toxicidad aguda de las plantas medicinales.	27
Efectos de los extractos vegetales sobre la letalidad del veneno del alacrán <i>Centruroides limpidus limpidus</i>	27

Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	28
a) Modelo de íleon aislado de cobayo	28
b) Modelo de aurículas aisladas de rata.	29
c) Inflamación neurogénica en páncreas aislado de rata medida por extravasación de azul de Evans	30
d) Liberación de amilasa en el páncreas aislado de Ratón	31
e) Determinación de la amilasa por el método amiloclástico yodométrico	32
f) Determinación de parámetros cinéticos de amilasa	32
g) Determinación de amilasa por un método Inmunoenzimático	33
h) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de origen porcino y de origen murino	33
i) Esquema de inmunización de cobayos	34
Análisis estadístico	34
Resultados	35
Obtención de los extractos	35
Pruebas de toxicidad de los extractos vegetales	35
Efecto producido por los extractos vegetales sobre la DL <sub>50</sub> del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en ratón	35
Evaluación del efecto producido por los extractos vegetales sobre la contracción inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en el íleon aislado de cobayo	36
Evaluación del efecto inotrópico y cronotrópico del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en aurículas	38

aisladas de ratas y los efectos antagónicos de los extractos vegetales	
Efectos de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i> y <i>Bouvardia ternifolia</i> en la liberación de amilasa inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre el páncreas aislado de ratón	45
Evaluación del efecto de extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> en la liberación de amilasa por un método inmunoenzimático	57
a) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la amilasa de ratón y de origen porcino	57
b) Cuantificación de la amilasa de ratón	67
Inflamación neurogénica del páncreas y el efecto tóxico del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en ratas integrales y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i> y <i>Bouvardia ternifolia</i>	69
Discusión	71
Conclusiones	79
Referencias bibliográficas	80

## Índice de Figuras

Figura 1. Sitios de unión hipotéticos para las toxinas específicas al canal de sodio	14
Figura 2. Modelo didáctico del canal de sodio voltaje-dependiente, que muestra la cinética del canal	14
Figura 3. Esquema de los elementos estructurales del canal de sodio voltaje-dependiente	15
Figura 4. Registro de contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> y efecto del extracto de <i>Aristolochia elegans</i> .	37
Figura 5. Registro de contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> y efecto del extracto de <i>Bouvardia ternifolia</i> Schtdl	37
Figura 6. Inhibición de la contracción de íleon aislado de cobayo producido por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i> y <i>Bouvardia ternifolia</i>	38
Figura 7. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i>	39
Figura 8. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i>	39
Figura 9. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i>	40
Figura 10. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i>	40
Figura 11. Registro actividad contráctil de aurículas Aisladas de rata y el efecto de veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> , y el efecto antagónico del extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i>	41
Figura 12. Detalle del registro del comportamiento basal de la contracción de aurícula de rata	42

Figura 13. Detalle del registro del efecto del veneno sobre la contracción de aurícula de rata en el periodo que cubre del segundo 70 al 74.	43
Figura 14. Detalle del registro del efecto del veneno sobre la contracción de aurícula de rata en el periodo que cubre del segundo 77 al 81	43
Figura 15. Detalle del Registro del efecto del extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i> en el periodo que cubre del segundo 100 al 124	44
Figura 16. Curva de concentración-respuesta liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón. El efecto del tiempo exposición veneno	45
Figura 17. Velocidad de liberación de amilasa en Páncreas aislado de ratón	46
Figura 18. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón	47
Figura 19. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), para la determinación de las constantes cinéticas de la amilasa pancreática	48
Figura 20. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia de extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	49
Figura 21. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	49
Figura 22. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia de extracto metanólico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	50
Figura 23. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto metanólico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	51
Figura 24. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico, extracto metanólico de <i>Bouvardia ternifolia</i> comparado y sin extractos	51

Figura 25. Efecto de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón	52
Figura 26. Efecto de los extractos de <i>Aristolochia Elegans</i> sobre la liberación de amilasa en páncreas Aislado de ratón	54
Figura 27. Curva de concentración-respuesta de Liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, Expuesto carbamilcolina	55
Figura 28. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de <i>B. ternifolia</i> sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón estimulado con carbamilcolina	56
Figura 29. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de <i>Arsitolochia elegans</i> sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón estimulado con carbamilcolina	57
Figura 30. Curva estándar para la determinación de amilasa por el método de ELISA.	68
Figura 31. Efecto de contención de la descarga Pancreática de amilasa, medida por ELISA, por los Extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	68
Figura 32. Efecto de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> Sobre la extravasación de líquido plasmático de en Páncreas de ratas intoxicadas con veneno de <i>Centruroides limpidus Limpidus</i>	70
Figura 33. Efecto de los extractos de <i>Aristolochia Elegans</i> sobre la extravasación de líquido plasmático de en páncreas de ratas intoxicadas con veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i>	70

## Indice de Tablas

Tabla 1. Accidentes por picadura de alacrán	9
Tabla 2. Tasa de picadura de alacrán en México	10
Tabla 3. Determinación de la capacidad antitóxica de Extractos vegetales	36
Tabla 4. Resumen de constantes cinéticas de amilasa	53
Tabla 5. Comparación de secuencias de aminoácidos de amilasa	59

Kv1	Canales de potasio dependientes de voltaje (shaker) tipo I
ERG	Canales de potasio Ergotoxin-like genes
ATP	Trifosfato de adenosina
PAF	Factor activador de plaquetas
Ach	Acetilcolina
HPMIMSS	Herbario de plantas medicinales de Instituto Mexicano del Seguro Social
<i>i.v.</i>	Vía intravenosa
ELISA	Enzyme linked immune assay
PCGENE	Programa de computo para comparación de secuencias de aminoácidos
MeOH	Extracto metanólico
Hex	Extracto hexánico
Bt	<i>Bouvardia ternifolia</i>
Ae	<i>Aristolochia elegans</i>
D.E.	Desviación estándar
LPM	Latido por minuto
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$V_{max}$	Velocidad máxima
$K_{Mapp}$	Constante de Michaleis-Menten aparente
$V_{maxi}$	Velocidad máxima de la reacción inhibida
$CE_{50}$	Concentración efectiva 50%
$E_{max}$	Efecto máximo
$K_i$	Constante de inhibición
$\Delta E_{max}$	Diferencial de efecto máximo
Ah	Indice de hidrofiliidad promedio
<i>i.p.</i>	Vía intraperitoneal

## RESUMEN

En México, el envenenamiento por alacrán se considera un problema de Salud Pública, cuyo tratamiento es la administración de suero hiperinmune. Sin embargo, en la medicina tradicional mexicana diferentes especies de plantas han sido ampliamente utilizadas como un remedio para el tratamiento de la intoxicación por alacranes. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de los extractos hexánicos y metanólicos *Bouvardia ternifolia* y *Aristolochia elegans* en diferentes modelos animales experimentales que permiten evaluar los efectos tóxicos del veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*. Se midió el efecto de los extractos orgánicos de estas plantas sobre la letalidad del veneno en ratón determinado su  $DL_{50}$ ; su actividad antagónica sobre la contracción de íleon aislado de cobayo inducida por el veneno, su actividad inhibitoria de las alteraciones del ritmo en la aurícula aislada de rata provocadas por veneno; su efecto antiinflamatorio del páncreas en rata y la liberación de amilasa en el páncreas aislado de ratón, provocados por la administración de veneno de *C. limpidus limpidus*.

Los extractos hexánico y metanólico de *B. ternifolia* modificaron la  $DL_{50}$  del veneno de *C. limpidus limpidus* de  $0.750 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  a  $1.64$  y  $1.16 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , respectivamente. Los extractos hexánico y metanólico de *A. elegans* produjeron una menor actividad antitóxica,  $1.04$  y  $0.984 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . En pruebas *in vitro*, la adición de los extractos de *B. ternifolia* y *A. elegans* inhibieron de manera importante, la contracción del íleon aislado de cobayo, el efecto inotrópico positivo

en aurícula, la inflamación aguda del páncreas en rata íntegra y la liberación de amilasa del páncreas aislado de ratón. Todos estos efectos inducidos por el veneno de alacrán de manera dependiente de la concentración. En general, los resultados demostraron que los extractos de estas plantas antagonizan las acciones del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en los modelos experimentales estudiados.

## ABSTRACT.

In Mexico, scorpion envenomation is considered a public health problem, treatment is hyperimmune sera administration. However, in the Mexican traditional medicine, different plant species have been widely used as a remedy for treating scorpion poisoning. The aim of this work was to analyze the effect of *Bouvardia ternifolia* and *Aristolochia elegans* over different biological models that measured the toxic effects of *Centruroides limpidus limpidus* venom.

The effect of this plants on the venom lethality in mice, the antagonistic activity on isolated guinea pig ileum contraction, the antagonistic activity on isolated rat atria, over acute inflammation of rat pancreas and the release amylase in isolated pancreas mouse, induced by the venom of *C. limpidus limpidus* was evaluated.

The hexanic and methanolic extract from *B. ternifolia* modified the LD<sub>50</sub> of *C. limpidus limpidus* venom from 0.750 mgKg<sup>-1</sup> to 1.64 and 1.16 mg·Kg<sup>-1</sup>, respectively. The hexanic and methanolic extracts of *A. elegans* produced lower antitoxic activity, 1.04 and 0.984 mg·Kg<sup>-1</sup> respectively. On *in vitro* test, addition of *B. ternifolia* and *A. elegans* extracts inhibited significantly isolated guinea pig ileum contraction, isolated rat atria positive inotropic effect, acute inflammation of whole rat pancreas and the amylase release in the isolated mice pancreas, all these induced by scorpion venom in a concentration dependent mode. In general, the results demonstrated the effectiveness of these two plant species for decreasing the lethality and the toxic effects of *C. limpidus limpidus* venom in experimental model.

## INTRODUCCIÓN.

El envenenamiento por picadura de alacrán es un problema de salud social que, aunque muy localizado, suele ser más frecuente en aquellas comunidades donde el acceso a centros de salud es difícil y donde la población infantil es, además, afectada por la desnutrición.

Es necesario resaltar que el veneno de alacrán desencadena en los animales de laboratorio un cuadro fisiopatológico complejo. Que lo hace, un modelo farmacológico excelente, no sólo en el estudio del padecimiento, sino también, en el análisis de las plantas que han sido usadas en el tratamiento del envenenamiento por picadura de alacrán.

Como modelo farmacológico resulta muy enriquecedor debido a que se pueden estudiar aquellas plantas que modulen o restablezcan la fisiología que ha sido afectada por el veneno. Bajo el esquema del cuadro fisiopatológico, se pueden proponer varios modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que permiten evaluar de manera separada los mecanismos involucrados en la intoxicación. Es el caso de los desordenes cardíacos debidos a la liberación masiva de neurotransmisores, como acetil colina y catecolaminas, así como por la modificación en la excitabilidad de células del músculo cardíaco. Otros procesos fisiológicos afectados son los provocados por la inflamación que resulta de la intoxicación, como el edema agudo de pulmón y páncreas que puede ser monitoreado por extravasación de albúmina; además de los desordenes en la presión arterial y neurológicos.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antitóxica de algunas plantas medicinales tradicionalmente utilizadas en la herbolaria mexicana, para el tratamiento de los síntomas por envenenamiento por picadura de alacrán, como es el caso de *Bouvardia terniflora* y *Aristolochia elegans*. Lo cual, se llevó a cabo en diferentes modelos que evalúan el efecto producido por el extracto vegetal sobre: la DL<sub>50</sub> del veneno de alacrán en ratones sanos, la contracción inducida con veneno en el íleon aislado de cobayo, la fuerza de contracción de aurículas aisladas de rata; la pancreatitis en rata íntegra; el efecto secretagogo en páncreas y la cinética enzimática de amilasa.

El propósito de la investigación farmacológica de extractos de plantas medicinales va más allá que el justificar el uso etnobotánico de los recursos vegetales. Ya que la búsqueda de sustancias activas mediante el análisis químico y farmacológico de las plantas ha generado la producción de novedosos fitomedicamentos, cuya principal característica es estar constituido por una mezcla de sustancias químicas, a las cuales se les atribuye un efecto determinado, que puede ser el resultado de una acción sinérgica entre sus constituyentes. La ventaja de algunos fitomedicamentos es contar en un solo producto, una alternativa para manejar la complejidad de cuadros patológicos como es el caso de la picadura de alacrán.

## **ANTECEDENTES.**

### **El alacranismo en México**

Los alacranes son uno de los grupos de animales más antiguos sobre la tierra (más de 400 millones de años de evolución), pertenecen a la clase aracnidae, orden scorpionida y están representados por 1500 especies distribuidas alrededor del mundo, agrupadas en seis familias: Buthidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Chactidae, Vejoidae y Bothriuridae. Aunque todos los alacranes son venenosos, menos de 50 especies (pertenecientes a la familia Buthidae) pueden ser considerados como peligrosos para el hombre (Keegan 1980, Dehesa-Dávila y col., Hoffman 1993).

Los alacranes se encuentran en las áreas tropicales, subtropicales y en las regiones más cálidas de las áreas templadas del mundo. Se distribuyen aproximadamente desde los 52° latitud norte y los 42° de latitud sur. Pueden habitar en regiones a nivel del mar y hasta 2,500 metros de altitud, el número de especies es mayor conforme la altitud disminuye. La distribución de las diferentes especies depende de microambientes que sean adecuados para su subsistencia.

Debido a las características geográficas, en todo el territorio mexicano por debajo de los 2500 metros, con una gran variedad de ambientes y una enorme diversidad de flora y fauna, existen especies diversas de animales ponzoñosos y entre ellos los alacranes. Anualmente, en el mundo se reportan un número considerable de muertes por picadura de alacrán, siendo nuestro país uno de los que presentan los más altos índices de morbilidad. De las 136 especies y

subespecies de alacranes que se encuentran en México, solo ocho tienen importancia clínica (Hoffmann y Nieto 1939; Dehesa-Dávila y col. 1995); siendo los del género *Centruroides* los responsables de la mayoría de los accidentes. Las especies que pertenecen a este género se distribuyen en la región litoral del océano Pacífico, cuenca del río Balsas, algunos estados centro-occidentales y en el noreste del país.

La distribución geográfica específica del género *Centruroides* con importancia en la salud pública es: *C. elegans* (Nayarit, Jalisco, Michoacán, Colima y Guerrero), *C. infamatus infamatus* (Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato y Michoacán), *C. limpidus limpidus* (Colima, Morelos y Guerrero), *C. limpidus tecomanus* (Colima), *C. noxius* (Nayarit), *C. pallidiceps* (Sonora, Sinaloa y Arizona EUA), *C. sculpturatus* (Sonora; Arizona y Nuevo México EUA) *C. suffusus suffusus* (Durango) (SSA 1999; Dehesa-Dávila y Posanni 1994). Los estados de Colima, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla y Sinaloa, presentan la mayor incidencia de picadura de alacrán. Según los registros de la Secretaría de Salud, el número de accidentes por año se ha ido incrementando. Sin embargo, se estima que estos datos representan un 25% del total de accidentes, esta estimación se debe, probablemente, a que existe un subregistro de éstos. La falta de exactitud en los registros del número de accidentes y muertos que se presentan anualmente, explica en parte las inconsistencias de los datos que se observan en la tabla 1. Se estima que hay alrededor de 300,000 intoxicados por picadura de alacrán por año, con una mortalidad de entre 1000 - 2000 muertes (WHO 1981). En el 2002 se señalaron más de 220 000 casos de intoxicación en todos los estados del país (SSA 2002), además, se estima que 8

de 10 defunciones debidas a las picaduras de alacrán se concentran en los estados de Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla y Morelos (Granja y col. 1999).

Tabla 1. Número de accidentes por picadura de alacrán reportados en los estados con mayor índice de picaduras y el total en todo el país.

Estado/Año	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Colima	8,013	9,493	9,362	12,475	12,114	9,769	8,227	8,777	9,334
Guanajuato	3,240	4,928	4,505	8,791	12,017	12,188	21,645	24,728	20,696
Guerrero	420	74	7,428	13,825	15,666	14,393	19,173	21,195	21,894
Jalisco	7,611	4,862	27,338	23,987	23,418	27,295	34,559	41,824	41,919
Michoacán	5,729	9,902	5,729	9,902	26,078	24,318	24,545	26,068	26,606
Morelos	18,245	3,610	23,243	26,987	23,808	30,202	26,745	31,311	28,625
Nayarit	273	3,183	8,461	9,606	9,970	10,560	12,968	12,962	13,829
Puebla	515	4,765	8,193	9,813	12,871	11,976	10,786	12,533	12,978
Sinaloa	221	52	4,218	5,166	6,168	8,585	6,700	7,060	7,477
Total	43,636	33,948	108,359	137,282	161,121	167,473	189,789	212,861	210,241

Al comparar lo que sucede respecto a la morbilidad relativa, se puede apuntar que el estado de Morelos presenta la mayor tasa de picadura como se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Se muestra el cálculo de la tasa picaduras en porcentaje, de acuerdo a la población reportada en el Censo de Población y Vivienda del año 2000 (INEGI).

Estado	Picaduras año 2000	Población año 2000	Tasa de picadura (%)
Colima	9,769	542,627	1.8
Guanajuato	12,188	4,663,032	0.26
Guerrero	14,393	3,079,649	0.47
Jalisco	27,295	6,322,002	0.43
Michoacán	24,318	3,988,670	0.61
Morelos	30,202	1,555,296	<b>1.94</b>
Nayarit	10,560	920,185	1.15
Puebla	11,976	5,076,686	0.24
Sinaloa	8,585	2,536,844	0.34

## **Fisiopatología de la intoxicación por picadura de alacrán.**

El veneno de alacrán provoca alteraciones funcionales de diversos órganos y tejidos, como consecuencia de la liberación súbita y masiva de acetilcolina y catecolaminas de las terminales nerviosas, debido a la sobre-estimulación que efectúan las toxinas sobre los canales de sodio activados por voltaje. (Bablito y col. 1986; Matos y col. 1999). Esto explica la patogénesis de los daños neurológicos, cardiovasculares, hemodinámicos, con cambios electrocardiográficos, metabólicos y hormonales, además del edema pulmonar y pancreático (Karnad 1998; Bawaskar y Bawaskar 1997; Gueron y Sofer 1994). Se ha catalogado al envenenamiento por picadura de alacrán como un síndrome de déficit de energía y de capacidad para utilizar los sustratos metabólicos existentes por los órganos vitales, lo cual provoca una "falla orgánica multi sistema" y en el peor de los casos la muerte (Murugesan 1999).

Algunos de los signos y síntomas que se manifiestan después de la picadura de alacrán son: hipertermia, taquipnea, disnea, hiperexcitabilidad, taquicardia o bradicardia, distensión abdominal, lagrimeo, salivación profusa, náusea, vómito, nistagmus, midriasis, fotofobia, rinorrea, disfagia, sensación de "pelos" en la garganta, disfonía, tos, aumento de la secreción bronquial, edema pulmonar, hipertensión e hipotensión, falla cardíaca, choque circulatorio, convulsiones, ataxia, fasciculaciones y coma (Flores PR 1963; Lagunas-Flores y Rojas-Molina 1983).

La semiología del padecimiento puede ser explicada, con base en la capacidad de las toxinas del veneno de alacrán para actuar en los canales de sodio de las terminales neuronales. Estas tóxicas provocan la despolarización de

membranas axonales con la consecuente liberación masiva de neurotransmisores, los cuales, estimulan a varios órganos incluyendo: el intestino, corazón y tejido vascular. Existen evidencias experimentales de que la acetilcolina y la noradrenalina son los mediadores de muchas de las alteraciones fisiológicas producidas por el veneno (Cunha-Melo col. 1973; Romano-Silva col. 1994; Matos y col. 1999<sup>a</sup>; Matos y col. 1999<sup>b</sup>).

La salivación excesiva, la náusea, el vómito, el incremento de la motilidad intestinal y la distensión abdominal que se observan frecuentemente, son manifestaciones parasimpáticas que se explican básicamente por la acción de las toxinas sobre las neuronas colinérgicas del nervio vago (Dehesa-Dávila, y col. 1995).

### **Toxinas del veneno de alacrán.**

Las acciones del veneno de alacrán en cada órgano de la economía, tanto en humanos como en animales experimentales, se deben básicamente a los efectos de las toxinas. Los venenos son mezclas complejas de mediadores químicos, como enzimas, nucleótidos, lípidos, mucoproteínas, aminas biogénicas y péptidos. Estos últimos, son los responsables de los síntomas de intoxicación, y tienen como blanco a canales iónicos. Además, constituyen el grupo de sustancias mejor estudiadas del veneno de los alacranes.

Existen diferentes familias de toxinas que han sido clasificadas por su especificidad de acción sobre canales iónicos, como los de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>++</sup>. Dentro del género *Centruroides*, hay dos grupos de péptidos estructuralmente parecidos. Los péptidos, de cadena grande afectan al canal de Na<sup>+</sup> dependiente

de voltaje y los de cadena corta bloquean al canal de  $K^+$  dependiente de voltaje del tipo  $K_v1$  (Possani y Col. 1999) y ERG (“Ergtoxin-like genes”) (Corona y col. 2002). De tal forma, que las acciones de las toxinas se ejercen principalmente sobre las membranas de las células excitables, como las células nerviosas y del tejido muscular. La unión de estas toxinas a los canales catiónicos es causante de muchos de los síntomas tóxicos del veneno (Dehesa-Dávila y col. 1995).

Las toxinas de alacrán, que actúan sobre el canal de  $Na^+$ , son péptidos que están compuestos de 60-76 aminoácidos, altamente estables por su bajo peso molecular y por 4 puentes disulfuro que consolidan la estructura tridimensional (Caterall 1980; Fontecilla-Camps y col 1980; Leberon y col. 1994; Possani y col. 1999). Estas toxinas modulan los mecanismos de disparo de las células excitables y, dependiendo de la forma en que lo hacen, se dividen en dos grupos: toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  (Bontems y col. 1991; Bruix y col. 1993).

Las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  que actúan sobre el canal de sodio de las células excitables provocan el disparo espontáneo y repetitivo (Müller 1993), ya sea retardando la inactivación o prolongando la activación, esto se ha demostrado en células nerviosas, unión neuromuscular, músculo cardíaco, íleon y páncreas (D'Suze 1996, Yatani y col. 1988; Dinitz y col 1974; Gallagher y col 1981). La toxina  $\gamma$  de *Tityus serrulatus* y la toxina de Cn II-10 del *Centruroides noxius* se unen a los canales de  $Na^+$  de miocitos con igual afinidad que a las células nerviosas (Yatani y col. 1988).

Las toxinas  $\alpha$  se unen al sitio 3 del canal de  $Na^+$  (Gordon y col. 1996; Rogers y col. 1996, Bablito y col 1986) en la zona extracelular (Rogers y col. 1996),

retrasando o bloqueando la inactivación rápida, (Gordon y col. 1996; Bablito y col. 1996) inhibiendo el cierre de la compuerta de inactivación permitiendo la corriente de sodio, prolongando los potenciales de acción (Gordon y col. 1996, Roger y col. 1996), bloqueando la cinética de inactivación rápida (Gordon y col. 1996, Bablito y col. 1986) de manera dependiente del voltaje.

Las toxinas  $\beta$  se unen al sitio 4, modifican los mecanismos de activación, sin alterar la inactivación, por lo que al compararlo con la actividad de las toxinas  $\alpha$  presenta un menor efecto en cuanto a las corrientes de  $\text{Na}^+$  (Bablito y col. 1986), prolongando significativamente la apertura del canal e incrementando la corriente de sodio. Estas toxinas se unen al canal de  $\text{Na}^+$  de manera independiente del voltaje (Yatani y col. 1988).

Los canales de sodio dependientes de voltaje de mamífero, son un complejo de glicoproteínas con tres subunidades transmembranales  $\alpha$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (Gordon y col. 1996).

La subunidad  $\alpha$  se compone de cuatro dominios homólogos (I a IV), cada uno constituido por seis  $\alpha$ -hélices (S1 a S6). En la despolarización, tales dominios presentan un cambio conformacional debido a variaciones de voltaje (-90 a +35 mV), que permite la apertura del canal y la entrada de sodio. Al alcanzar el pico máximo de despolarización se produce otro cambio conformacional, que conduce al cierre de la compuerta de inactivación o puerta  $h$ , ocluyéndolo e impidiendo la corriente del ion (Catterall y Mackie 1996). Los dominios S4 de la subunidad  $\alpha$  detectan las modificaciones en el potencial de membrana, provocando cambios conformacionales en la compuerta  $h$ . Donde los residuos de lisina o arginina con

carga positiva del S4 se unen a las cargas negativas del espacio intracelular (Rogers y col. 1996). La compuerta de inactivación es un dominio intracelular corto que conecta los dominios intracelulares III y IV y probablemente se pliega hacia el interior de la boca intracelular del poro, ocluyéndolo unas milésimas de segundo después de abrirse el canal (Rogers y col. 1996).

Las toxinas  $\alpha$  del alacrán actúan probablemente en el asa extracelular que une a los segmentos 3 y 4 del dominio IV. Durante la despolarización, el segmento S4 del dominio IV, se mueve del espacio extracelular a la parte interna del canal, entonces la toxina unida a través del IVS3-S4 puede disminuir este movimiento o los cambios conformacionales requeridos para la inactivación rápida. No se conoce con exactitud el sitio de fijación de las toxinas  $\alpha$  (Rogers y col. 1996).

Dentro de las toxinas del veneno de alacrán existen péptidos que reconocen al canal de potasio, aunque en muchas de ellas no ha sido demostrada la actividad tóxica, por lo tanto, en general se les conoce como ligandos dirigidos contra el canal de potasio. La noxiustoxina fue la primera toxina específica contra el canal de potasio y fue aislada del *Centruroides noxius* (Carbone y col. 1982). Con excepción de la noxiustoxina, la actividad biológica de este tipo de toxinas en mamíferos no ha sido muy relevante, probablemente porque, las cantidades presentes en el veneno son muy pequeñas (menos del 0.1%) (Olamendi-Portugal y col. 1996; Romi-Lebrun y col. 1997). Las toxinas específicas para el canal de potasio son péptidos que contienen 29 a 39 aminoácidos, y son estabilizados por 3 puentes disulfuro (Possani 1999).

## **Efecto del veneno sobre el páncreas**

El 80% de los picados de alacrán desarrollan pancreatitis, lo cual se reporta para alacranes americanos del género *Tityus*. También se ha mencionado el desarrollo de pancreatitis inducida por la intoxicación con veneno de alacranes nor-africanos del género *Leiurus* (Sofer 1991; Possani 1991; Fletcher 1994). Esto puede explicarse en principio por la liberación de acetilcolina en las inervaciones del páncreas, ya que no han sido descritos los canales de sodio en células acinares del páncreas. Las toxinas de veneno del alacrán *T. serrulatus*, que afectan al canal de  $\text{Na}^+$ , tienen un efecto secretagogo sobre el páncreas y lo hacen de manera similar a la carbamilcolina, un análogo de acetilcolina y actúa como agonista sobre los receptores muscarínicos; esta acción provoca toxicidad sobre el páncreas, lo cual se ha observado en el cobayo (Possani 1991).

A nivel celular, el desarrollo de la pancreatitis inducida por la intoxicación con veneno de alacrán provoca la presencia de grandes agregados en la región comprendida entre la región *cis* del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico de las células acinares (Possani 1991), hecho que se corrobora con estudios de microscopía electrónica, y se observa que éstos son estructuras formadas por elementos tubulares (Fletcher 1994). En las células acinares, también se ha visto que durante el consumo exhaustivo del ATP por anoxia con  $\text{N}_2$ , se forman tales agregados.

El 60% de muertes de pacientes con pancreatitis aguda sucede en los primeros 7 días, después de la picadura, con falla respiratoria aguda, la relación entre estos dos eventos no está del todo clara (Zhou 1992). Sin embargo, la liberación de enzimas proteolíticas o hidrolíticas derivadas del páncreas hacia la

circulación sistémica determina el desarrollo del daño pulmonar. El daño pancreático también provoca la liberación de otros mediadores celulares como el “Factor Activador de Plaquetas” (PAF, por sus siglas en inglés), el cual es un potente mediador químico que actúa como señal durante el proceso inflamatorio y está bien establecido como mediador del daño pulmonar. Los efectos a nivel pulmonar, no se explican tan fácilmente después de que el páncreas libera PAF o enzimas hidrolíticas, es evidente que no es un mecanismo simple, ya que por ejemplo la administración endovenosa de fosfolipasa A<sub>2</sub> provoca daño pulmonar en ratas con pancreatitis y no produce daño en ratas normales, lo que indica que existe un conjunto de factores involucrados en el daño pulmonar (Matos 1997).

El edema pulmonar agudo, especialmente en niños, es un signo de mal pronóstico, que regularmente va acompañado por una letalidad significativamente alta (Amaral 1992). En rata, dos mecanismos distintos parecen contar en el daño pulmonar posterior a la intoxicación con veneno de alacrán: el primero, es la falla ventricular izquierda aguda debida a una hipertensión arterial sistémica seguida de una liberación de catecolaminas; el segundo, es el incremento de la permeabilidad vascular secundaria a la liberación de mediadores de la inflamación como el PAF. La administración de heparina o antagonistas del PAF previenen el edema agudo de pulmón provocado por veneno de *Tityus serrulatus* (Amaral 1993). También la heparina reduce la permeabilidad vascular producida por histamina, bradicidina y prostaglandinas. La inyección previa de inhibidores de la 5-lipoxigenasa (MK-886) o cicloxigenasa (aspirina o indometacina) disminuye la magnitud del edema inducido por el veneno de alacrán (Matos 1999<sup>a</sup>). Otro mecanismo posible es que el veneno induzca la liberación de neuropéptidos como la sustancia P. Esto se ha

observado en el modelo de íleon aislado de cobayo (Matos 1999<sup>a</sup>), este neuropéptido, a su vez, induce la liberación de mediadores de la inflamación en leucocitos, células cebadas y macrófagos (Brain 1997; Ho 1998).

### **Efectos del veneno de alacrán sobre el sistema cardiovascular.**

De los aparatos y sistemas afectados por el veneno de alacrán, el cardiovascular es el más ampliamente estudiado. Entre los efectos cardiovasculares secundarios a la picadura de alacrán se encuentra: el daño al miocardio, falla cardiaca, arritmias, hipertensión, hipotensión, edema pulmonar y falla respiratoria (Gueron 1992). Los mecanismos subyacentes a la intoxicación son de particular importancia clínica y farmacológica (Ismail 1995).

En general, se considera que los efectos cardiovasculares después de la intoxicación, están mediados a través de la estimulación del sistema nervioso autónomo, con una predominancia sobre el sistema simpático, por lo que se observa marcado cronotropismo e inotropismo positivos básicamente por la liberación tisular y medular de catecolaminas. Dichos efectos son bloqueados por fármacos como el propranolol, bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, que implica la naturaleza noradrenérgica del efecto (Teixeira 2001). Además, se presenta bradicardia tardía, que es inhibida por atropina, un efecto sobre receptores colinérgicos; que se explica por la inhibición de la adenilciclase y el aumento de la conductancia a  $K^+$ , dando lugar a los efectos cronotrópico e inotrópico negativos de la ACh en el corazón (Lefkowitz 1996). La bradicardia tardía es fatal en el cuadro clínico del envenenamiento con toxinas de alacrán,(Goyffon 1982) probablemente su causa

sea más la isquemia miocárdica y la fatiga celular que la acción de la ACh (Gueron 1980).

Es importante destacar, que otra acción del veneno es probablemente modificar directamente la excitabilidad de la membrana de los miocitos, debido a que estas células tienen canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, los cuales son susceptibles de ser afectados por el veneno (Teixeira 2001). Además, la mayoría de los venenos producen una hipertensión pronunciada, tanto en animales de experimentación, como en las víctimas de intoxicación, sobretodo en niños. Es precisamente este efecto al que se considera el principal factor responsable de la falla cardíaca, así como del edema agudo de pulmón (Gueron 1992). La hipertensión secundaria a la picadura de alacrán también se asocia a la liberación masiva de catecolaminas; un fenómeno similar ocurre en el feocromocitoma. Aunque existe una diferencia importante, la hipertensión en el feocromocitoma es de corta duración, desapareciendo en muchos casos entre 15 y 60 minutos, provocando fallas cardíacas. En cambio, el veneno provoca una hipertensión de larga duración, la cual es más complicada y no se explica simplemente por la liberación masiva de las catecolaminas de las terminales nerviosas sistémicas y de la médula adrenal (Ismail 1995). Hay dos mecanismos por los cuales el veneno de alacrán puede producir aumento en la liberación de catecolaminas: por estimulación sobre las terminales nerviosas simpáticas con aumento de la secreción, y en la médula suprarrenal a través de la liberación de ACh por las fibras preganglionares y su interacción con los receptores nicotínicos de las células cromafines.

La hipertensión se produce por vasoconstricción periférica (que explica también la palidez) y por aumento en la fuerza contráctil del corazón a través de mediadores  $\beta$ 1-adrenérgicos (Lefkowitz 1996), también participa la liberación de renina por estimulación simpática  $\beta$ 1 de las células yuxtaglomerulares del riñón. Hecho que se demuestra con la elevación de los niveles séricos de renina y aldosterona en pacientes con síntomas sistémicos ocasionados por veneno de alacrán (Gueron 1992).

### **Antecedentes etnobotánicos, farmacológicos y químicos de la *Aristolochia elegans* y de la *Bouvardia ternifolia*.**

*Aristolochia elegans* Mast perteneciente a la familia Aristolochiaceae, es probablemente, la especie vegetal más ampliamente utilizada, en el estado de Morelos para el tratamiento de la intoxicación de pacientes con veneno de alacrán. De hecho la familia Aristolochiaceae es muy conocida desde la antigüedad, por sus aplicaciones terapéuticas, tales como: uterotónico, emenagogo, expectorante y antiespasmódico (Hernández 1969). Esta planta es utilizada en México como antimicrobiano, antitumoral, antidiarreico, antipirético, antiviperino y emenagogo (INI, 1994). Se ha demostrado farmacológicamente que las especies del género *Aristolochia* poseen actividad antiinflamatoria relacionada a la presencia del ácido aristolóquico, una sustancia característica del género. Este compuesto es un inhibidor específico de la fosfolipasa y por lo tanto es capaz de disminuir la liberación de mediadores pro inflamatorios y del dolor (Hutt and Houghton, 1998). También se ha demostrado que, debido a sus propiedades anticolinérgicas, los

extractos obtenidos a partir de diferentes especies de este género, modifican la actividad contráctil del íleon aislado de cobayo (Rastrelli, 1997).

*Bouvardia ternifolia* Schlttdl (Rubiaceae) es una planta endémica del altiplano mexicano; sus raíces se han utilizado dentro de la medicina tradicional, para el tratamiento de la mordedura de serpiente, piquete de alacrán, araña y ciempiés. Se le han descrito propiedades analgésicas y sedantes; aunque también se ha mencionado como antiviral (Aguilar et al. 1994; INI, 1994). De esta planta se aisló e identificó un hexapéptido cíclico que presenta actividad antitumoral, lo cual fue reportado por Shivanand y col. (Shivanand y col.1977). También se ha reportado la presencia de ácidos ursólico y oleanólico a los cuales se les han atribuido la propiedad hipoglucemiante mostrada por la *B. ternifolia* (Pérez et al. 1998).

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El alacranismo es un problema de salud pública en el estado de Morelos. Así lo muestra la tasa tan alta de incidencia (tabla 2). La especie de alacrán endémica de ese estado es la segunda en toxicidad dentro de las especies tóxicas del género *Centruroides* presentes en México (Dehesa 1995). Durante muchos años la medicina tradicional Mexicana ha utilizado algunas especies vegetales para el tratamiento de la picadura de alacrán. Con base en los resultados obtenidos en la encuesta IMSS-COPLAMAR (Lozoya 1987) el 53% de las 34 delegaciones que constituyen al IMSS se mencionó el uso de una Aristolochiaceae para contrarrestar la picadura de animales ponzoñosos. Sin embargo, a pesar de la importancia de este padecimiento, así como el uso de recursos herbolarios para su atención, en la literatura no se cuenta con estudios farmacológicos que permitan establecer que los extractos vegetales pueden disminuir la toxicidad del veneno de alacrán (Hutt y Houghton 1998).

De acuerdo con lo anterior se puede plantear la siguiente pregunta metodológica: “¿La *Aristolochia elegans* y la *Bouvardia ternifolia* tienen la capacidad de antagonizar los efectos tóxicos del veneno de alacrán *C. limpidus* *limpidus*, observados en animales íntegros, íleon aislado de cobayo, aurículas aisladas de rata y páncreas de ratas intoxicadas?

## HIPÓTESIS

Los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* inducen una disminución de las alteraciones funcionales ocasionadas por el veneno total de *Centruroides limpidus limpidus* en ratones íntegros, íleon aislado de cobayo, aurículas aisladas de rata y páncreas de ratas intoxicadas.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la disminución de las alteraciones funcionales provocadas por el veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, en diferentes modelos experimentales por los extractos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Evaluar la modificación causada por los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* sobre la toxicidad del veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, por aumento de la DL<sub>50</sub> en ratones.

Cuantificar la CE<sub>50</sub> del veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, en íleon aislado de cobayo, aurículas aisladas de rata y páncreas aislado de ratón en presencia de diferentes extractos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*.

Cuantificar los parámetros asociados a la pancreatitis, provocada por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, en presencia y ausencia de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*.

## **MATERIAL Y METODOS.**

### **Material vegetal**

La raíz de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlechter (Rubiaceae) se colectó en Coajomulco, Morelos, mientras que las raíces de *Aristolochia elegans* Mast, fueron obtenidas de la región oriental del estado de Guerrero. El material vegetal fue identificado por la M en C Abigail Aguilar Contreras, directora del herbario de plantas medicinales del IMSS. Se depositaron ejemplares para referencia con los siguientes números de registro (HPMIMSS13596), (HPMIMSS13595) y (HPMIMSS12050), respectivamente.

### **Preparación de los extractos.**

El material vegetal fue seleccionado y secado en la oscuridad a temperatura ambiente. El material seco y molido fue extraído exhaustivamente por percolación en n-hexano, el material vegetal extractado fue secado para eliminar completamente el disolvente y posteriormente fue extractado exhaustivamente con metanol. Ambos extractos fueron evaporados a sequedad en condiciones de vacío, almacenados entre 0°C y 4°C y protegido de la luz hasta que fueron utilizadas en las pruebas experimentales.

### **Preparación de veneno de alacrán de *Centruroides limpidus limpidus*.**

El veneno fue obtenido de una colonia de alacranes colectados de la región de Puente de Ixtla, Morelos y mantenidos en nuestro laboratorio. El veneno fue recolectado en cajas de Petri, por medio de un pulso eléctrico aplicado

directamente al telson de los animales. El material obtenido fue clarificado por centrifugación y posteriormente liofilizado y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta que fue usado. Para los ensayos, el veneno siempre fue disuelto en solución salina isotónica.

### **Animales de experimentación**

Se usaron ratones machos de la cepa Balb-C (20 – 22 g), ratas machos de la cepa Sprague-Dawley (200 – 250 g), cobayos machos de la cepa Hartley (350 – 450 g). Todos los animales fueron obtenidos de nuestro bioterio, donde se mantuvieron bajo condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), bajo un ciclo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, y con acceso libre a agua y alimento.

### **Pruebas de toxicidad aguda de las plantas medicinales.**

Los efectos letales de los extractos vegetales se determinaron de la siguiente manera: Se manejaron, durante la prueba dosis crecientes de los extractos (7.5, 15, 30, 60 y  $120 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), utilizando para cada una un grupo de 6 ratones, a los que se les administró un volumen constante de 0.5 ml por vía intravenosa (*iv*) por la vena caudal. La mortalidad fue evaluada a las 24 horas posteriores a la inyección.

## **Efectos de los extractos vegetales sobre la letalidad del veneno *Centruroides limpidus limpidus*.**

Se usaron cinco grupos de seis ratones de ambos sexos, que fueron tratados con las siguientes dosis crecientes de veneno, 0.69, 0.79, 0.9081, .044 y  $1.2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  en un volumen total de 0.5 ml. Los extractos secos de las plantas, fueron disueltos en solución salina isotónica y administrados simultáneamente con el veneno *i.v.* por la vena caudal en una dosis final de 50 mg/Kg. Otros cinco grupos de seis ratones recibieron las misma dosis de veneno y sirvieron como grupos control. La mortalidad fue determinada a 24 h post-inoculación.

### **Pruebas de antagonismo *in vitro*.**

#### **a) Modelo del íleon aislado de cobayo.**

Los cobayos fueron sacrificados por dislocación cervical; el íleon distal fue obtenido por laparotomía. El tejido obtenido fue cuidadosamente lavado con solución Tyrode, una sección de 2 cm aproximadamente fue disecado y colocado en una cámara de incubación con una capacidad de 3 ml. Un extremo del tejido se sujeto al fondo de la cámara por medio de un hilo de seda, mientras que el otro lado de tejido fue sujetado a un transductor de fuerza por medio de un hilo de seda, el cual fue conectado a un equipo digital de adquisición de datos (Maclab 8). El tejido fue mantenido con 1 g de tensión a  $37^{\circ}\text{C}$  en solución Tyrode (NaCl 136.9, glucosa 11.1,  $\text{NaHCO}_3$  11.9,  $\text{CaCl}_2$  1.4, KCl 2.7,  $\text{MgCl}_2$  0.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.4 mM, pH 7.4) y burbujeado con una mezcla de  $\text{CO}_2$  5% y  $\text{O}_2$  95%. Después de un periodo de 20 minutos de estabilización del tejido, a las condiciones de ensayo, se

adicionó una solución de acetilcolina (Sigma) a una concentración final de  $1 \times 10^{-4}$  M. Esta condición se considera como el 100% de la contracción alcanzada por el tejido y usada como referencia de la contracción máxima. Después de lavar cinco veces el tejido, se adicionan diferentes cantidades de veneno para ajustar a concentraciones crecientes ( $0.2 - 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se construyó una curva concentración respuesta. Finalmente los extractos de las plantas fueron adicionados a la cámara a las concentraciones de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 y  $360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  su efecto fue determinado en una curva concentración respuesta.

b) Modelo de aurículas aisladas de rata.

Las aurículas se obtuvieron de ratas sacrificadas por decapitación, el tejido disecado se colocó en solución de Ringer – Krebs (NaCl 119, glucosa 11.1,  $\text{NaHCO}_3$  25.0,  $\text{CaCl}_2$  2.5, KCl 4.7,  $\text{MgCl}_2$  1.0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, pH 7.4), a  $37^\circ\text{C}$  y burbujeado con una mezcla de  $\text{CO}_2$  5% y  $\text{O}_2$  95%. Las aurículas fueron colocadas en un cámara de perfusión de 2 ml sujeta al fondo de la cámara con un hilo de seda y el otro extremo fue sujetado con el mismo hilo a un transductor de fuerza, el cual fue conectado a un equipo digital de adquisición de datos (Maclab 8). El tejido se lavó 3 veces durante 30 minutos, al final de este periodo se registró las contracciones espontáneas de las aurículas determinando las condiciones basales de fuerza y frecuencia de contracción. A la cámara de perfusión se adicionaron concentraciones crecientes de veneno ( $0.35, 0.75, 1.5$  y  $2.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), a los 60 segundos se agregaron  $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extractos hexánico y metanólico de

*Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* y se evaluó el efecto producido sobre la fuerza y frecuencia de contracción.

c) Inflamación neurogénica en páncreas aislado de rata medida por extravasación de azul de Evans.

Este procedimiento se basa en el método descrito por Saria y Lundberg (1983), en el cual, se demuestra que el azul de Evans al ser administrado a ratas (*i.v.*) en el espacio vascular, se une fuertemente a la albúmina sérica, por lo que se mantiene en circulación y es retenido en el compartimento vascular. Cuando se presenta una discontinuidad en la barrera endotelial, ocurre la extravasación de la seroalbúmina, el azul de Evans fluye hacia al espacio intersticial y entonces puede ser cuantificado en el tejido. En este experimento, el Azul de Evans se administró por la vena femoral (a una dosis de  $30 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , en una solución de 3% en NaCl 0.9%), a ratas previamente anestesiadas (pentobarbital sódico,  $40 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  *i.p.*). Cinco minutos después (en grupos de 5 animales por experimento) se administraron diferentes dosis de veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (1, 20, 100 y  $500 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , *i.p.*). Los animales permanecieron con estas condiciones durante una hora, al término de la cual, los animales fueron perfundidos por la vía endovenosa con 50 ml de amortiguador de fosfato salino adicionado de 100 unidades $\cdot\text{mL}^{-1}$  de heparina, posteriormente se administró por la misma vía 200 ml de buffer de citratos 500 mM pH 3.5 adicionado de 1% de formaldehído. Después de la perfusión, la que permitió que toda la sangre haya sido eliminada del espacio vascular, se disecó el páncreas por laparatomía. El páncreas extraído fue pesado

e incubado 48 horas en formamida, para extraer el azul de Evans del intersticio, el colorante fue cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm. Para evaluar el efecto antagónico de las plantas sobre el edema pancreático producido por el veneno, se administraron *i.p.* extractos hexánicos y metanólicos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* a cuatro grupos de animales intoxicados con las mismas dosis de veneno ya planteadas. La administración de los extractos se realizó antes de la administración del azul de Evans, con una dosis de 50 mg·Kg<sup>-1</sup>.

#### d) Liberación de amilasa en el páncreas aislado de ratón.

El páncreas fue removido de ratones anestesiados (pentobarbital sódico 40 mg·Kg<sup>-1</sup>). Inmediatamente después, los lóbulos fueron separados y el tejido fue lavado con solución amortiguadora de fosfato 0.1 M y NaCl 0.15 M, pH 7.2. El páncreas separado fue sujetado con una seda calibre 2/0 en una cámara de vidrio de 2 ml, en solución Tyrode con un burbujeo continuo con una mezcla de 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>, a 37° C. Se lavó 3 veces en la misma solución mantenido el tejido durante 15 min. Una vez estabilizado el tejido se adicionaron diferentes cantidades de veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (0.00032, 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2 y 1 mg·mL<sup>-1</sup>) y se tomaron muestras del medio de incubación (200µl) después de 5, 10 y 15 minutos. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20°C hasta que la amilasa fue cuantificada por el método amiloclástico iodométrico, con el fin de determinar el efecto antagónico de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*, a una

concentración de  $0.039 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los extractos fueron adicionados 2 minutos antes de la adición del veneno de alacrán.

e) Determinación de la amilasa por el método amiloclástico iodométrico.

La mezcla de reacción consistió de  $250 \mu\text{l}$  de solución sustrato que contenía almidón ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en buffer de fosfato  $0.1 \text{ M}$  en  $\text{NaCl } 0.15 \text{ M}$  a  $\text{pH } 7.0$ ;  $5 \mu\text{l}$  de solución enzimática y se incubó  $37^\circ\text{C}$  durante 450 segundos. La reacción se paró al adicionar  $250 \mu\text{l}$  de solución de yodo ( $0.1 \text{ N}$ ) en  $\text{HCl } (0.02 \text{ N})$ . La mezcla de reacción se diluyó 1:10 con agua destilada y fue analizada espectrofotométricamente a  $640 \text{ nm}$  y comparado con curva estándar de almidón.

f) Determinación de parámetros cinéticos de amilasa.

Se realizó la determinación de la actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de sustrato ( $40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 440, 480, 600$  y  $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), determinando la cantidad de almidón hidrolizado a diferentes tiempos ( $0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420$  y  $520$  segundos). Con los valores de velocidad de hidrólisis, en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  en función de la concentración de almidón, se construyeron las gráficas de cinética enzimática; también se construyeron las gráficas de los inverso de la velocidad contra el inverso de la concentración. Para evaluar el posible efecto inhibitorio de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*, se realizó la determinación de los parámetros cinéticos de la amilasa en presencia

de los extractos vegetales cuando se realizó la determinación de velocidad de hidrólisis en función de la concentración de almidón.

g) Determinación de amilasa por un método inmunoenzimático.

Para evaluar el efecto secretagogo neto de amilasa provocado por veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, eliminando el efecto inhibitorio de los extractos vegetales, se montó una determinación de la presencia de amilasa, detectada por ELISA (enzyme linked immnue assay). Se obtuvo un suero hiperimmune de cobayo inmunizado con amilasa pancreática de origen porcino. Las placas de ELISA se sensibilizaron con amilasa pancreática y la determinación consistió en la disminución lineal de la reacción antígeno anticuerpo, por la competencia que se establece entre la amilasa fija a la placa y la que se adiciona en la muestra a determinar.

h) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de origen porcino y de origen murino.

Para efectuar la inmunización de los cobayos se utilizó amilasa pancreática de origen porcino. Para establecer el cruce inmunológico de la amilasa de origen porcino y murino se ingresaron las secuencias de ambas enzimas reportadas en la literatura, al programa PCGENE, para establecer la homología entre las secuencias utilizando varios criterios. En primer lugar establecer la comparación de toda la secuencia, eliminando en ambas proteínas el péptido líder. En segunda instancia comparar los segmentos de mayor índice de hidrofiliidad tanto en identidad, como en similitud.

i) Esquema de inmunización de cobayos

Un grupo de 3 cobayos se inmunizaron los días 0, 7, 14, 21, 28. La primera dosis consistió de 0.1 mg de amilasa en 0.5 ml adyuvante completo de Freund, las dosis posteriores se efectuaron con 0.1 mg en adyuvante incompleto de Freund. La vía de administración fue subcutánea, después del quinto refuerzo a los 28 días se realizó una sangría de prueba para determinar el título del suero. A los 32 días se realizó una sexta reinmunización y quince días después se efectuó la sangría en blanco de los cobayos hiperinmunes.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados fueron sometidos a un análisis de variancia (ANOVA) y los grupos de ensayo fueron comparados con los grupos control por la prueba "t" de *Student*. La probabilidad de 0.05 o menos fue considerada como significativa.

## RESULTADOS.

### Obtención de los extractos.

El rendimiento de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* fueron de 0.57 y 10.2 % y los de *Bouvardia ternifolia* de 0.83 y 5.5 respectivamente.

### Pruebas de toxicidad de los extractos vegetales

En las pruebas de letalidad, todos los extractos vegetales utilizados en esta investigación mostraron  $DL_{50}$  mayores a  $120 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  *i.v.* en ratón.

### Efecto producido por los extractos vegetales sobre la $DL_{50}$ del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en ratón.

La administración *i.v.* del veneno de *C. limpidus limpidus* a una muestra de ratones, resultó en una  $DL_{50}$   $0.750 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Cuando se administró simultáneamente el extracto hexánico y metanólico de *Bouvardia ternifolia*, se modificó la  $DL_{50}$  a  $1.64$  y  $1.16 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  respectivamente, siendo los extractos que presentaron una mayor capacidad de disminución de la toxicidad del veneno con 118 y 55%. Los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* mostraron una menor capacidad antitóxica, incrementando la  $DL_{50}$  a  $1.04$  y  $0.984 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , respectivamente; que corresponde a una disminución de la toxicidad de 31.2 y 38.8%. Como se observa en la tabla 3.

Al realizar el análisis estadístico de la determinación de la capacidad antitóxica, se observaron diferencias significativas con ambos extractos de

*Bouvardia ternifolia* y con el metanólico de *A. elegans*. El extracto hexánico de esta última planta presenta una capacidad antitóxica mayor. Sin embargo, debido a la dispersión de los datos no se muestra una diferencia estadísticamente significativa.

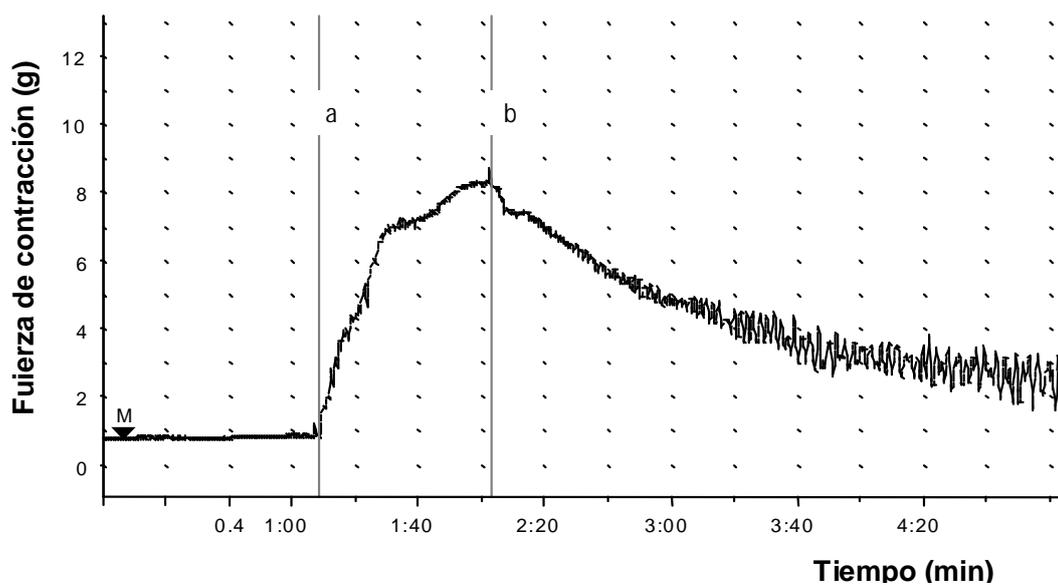
**Tabla 3.** Determinación de la DL<sub>50</sub> del veneno en presencia y ausencia de los extractos vegetales. Se muestra el promedio de 3 determinaciones.

	Veneno	MetOH Ae	Hexa Ae	MetOH Bt	Hexa Bt
DL <sub>50</sub>	<b>0.750</b>	<b>0.984</b>	<b>1.041</b>	<b>1.167</b>	<b>1.640</b>
D.E.	0.088	0.059	0.279	0.139	0.194
<i>p</i>		0.009	0.082	0.004	0.004

**Evaluación del efecto producido por los extractos vegetales sobre la contracción inducida por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en el íleon aislado de cobayo.**

En las figuras 1 y 2, se muestra un registro en tiempo real del íleon aislado de cobayo, donde se observa el comportamiento de la fuerza de contracción respecto al transcurso del tiempo del ensayo. En condiciones de reposo se mantiene una tensión de 1 g, a la adición del veneno *C. limpidus limpidus* se induce una contracción sustancial del tejido que se puede mantener por un periodo de 6 a 7 min, posterior a este periodo se observa una disminución de la

fuerza de contracción con contracciones repetitivas de baja intensidad. Después de este periodo el tejido se agota y no responde a un pulso de acetilcolina. El efecto producido por el veneno fue inhibido hasta en un 70%, de manera concentración dependiente, por la adición de los extractos de *B. ternifolia* (40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}$ ) y *A. elegans* (80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}$ )(figura 3).



**Figura 1. Registro que muestra la contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de *C. limpidus limpidus* (a) y efecto de la aplicación del extracto de *Aristolochia elegans* (b).**

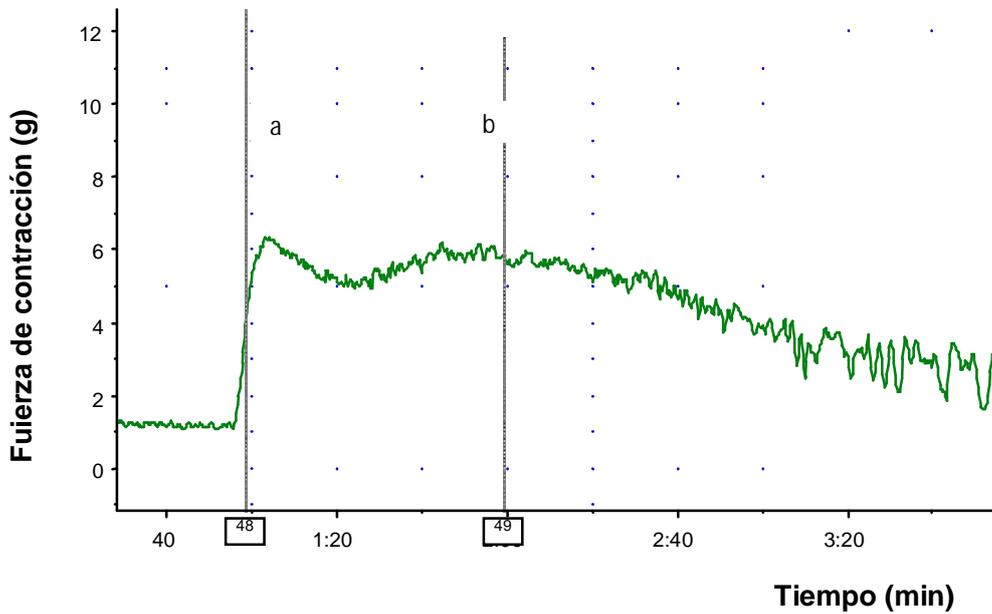


Figura 2. Registro que muestra la contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de *C. limpidus limpidus* (a), y efecto de la aplicación del extracto de *Bouvardia ternifolia* Schltl (b).

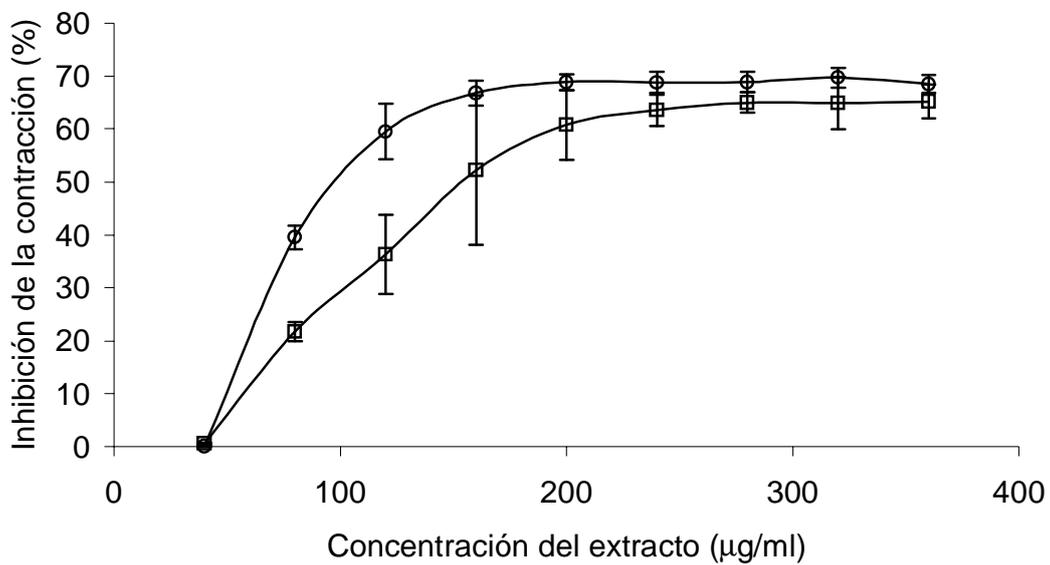


Figura 3. Inhibición producida por la adición de diferentes concentraciones de extractos hexánico de *A. elegans* (□) y *B. ternifolia* (○) sobre contracciones inducidas por 14 µg/ml de veneno de *C. limpidus limpidus* en íleon aislado de cobayo. Cada punto es el promedio de 5 determinaciones  $\pm$  D.E.

## Evaluación del efecto inotrópico y cronotrópico del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en aurículas aisladas de ratas y los efectos antagónicos de los extractos vegetales.

La administración de veneno en las aurículas aisladas de rata provocó un efecto inotrópico y cronotrópico positivo dependiente de la concentración. Cuando se administró el veneno la contracción alcanzó un efecto máximo de aproximadamente un 120% sobre la fuerza de contracción normal, al adicionar los extractos hexánico y metanólico de *B. ternifolia* y *A. elegans* disminuyeron significativamente el efecto inotrópico positivo provocado por el veneno, lo cual se observa en las figuras 4 y 6.

Respecto a la frecuencia de contracción, el veneno la incrementó de manera dependiente de la concentración, sin embargo ninguno de los extractos mostró capacidad de disminuir significativamente el efecto cronotrópico positivo provocado por el veneno (figuras 5 y 7).

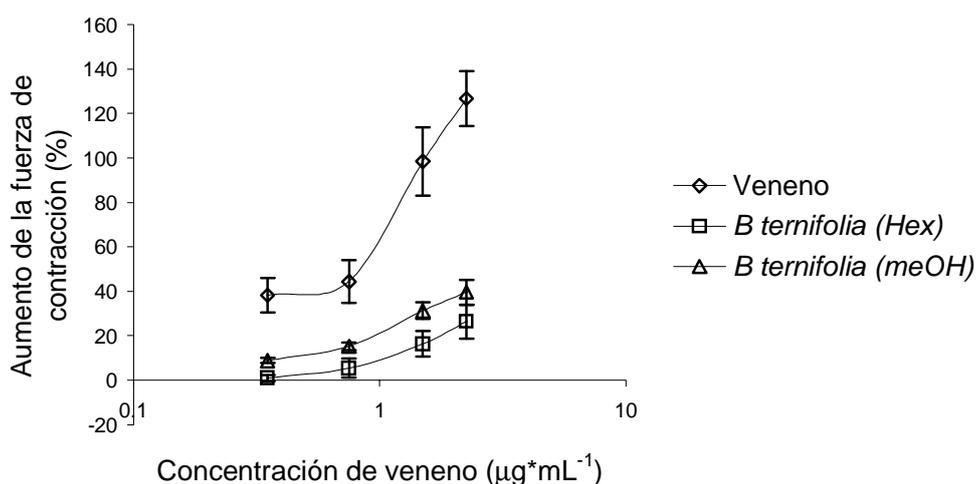


Figura 4. Efecto del extracto hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *B. ternifolia* sobre el efecto inotrópico positivo inducido por veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la la contracción espontánea de aurículas aisladas de rata. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  D.E.

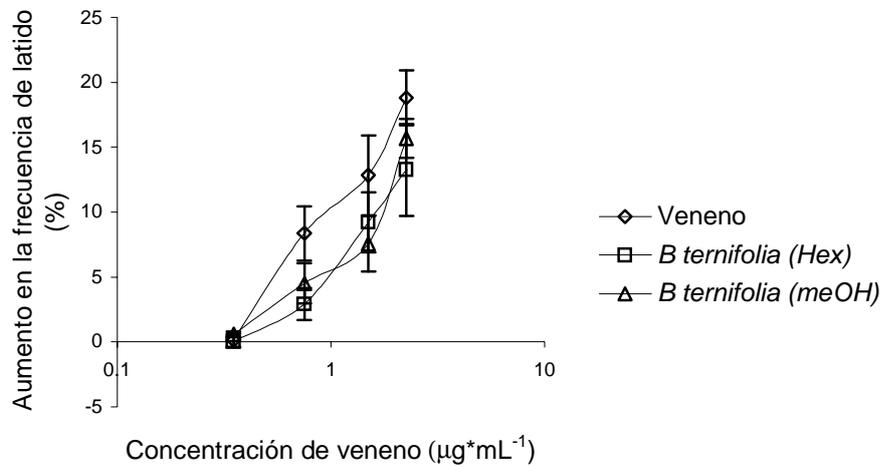


Figura 5. Efecto del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata (medido como porcentaje de aumento) y en presencia del extracto hexánico (Hex) y metanólico (meOH) de *Bouvardia ternifolia*. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  D.E.

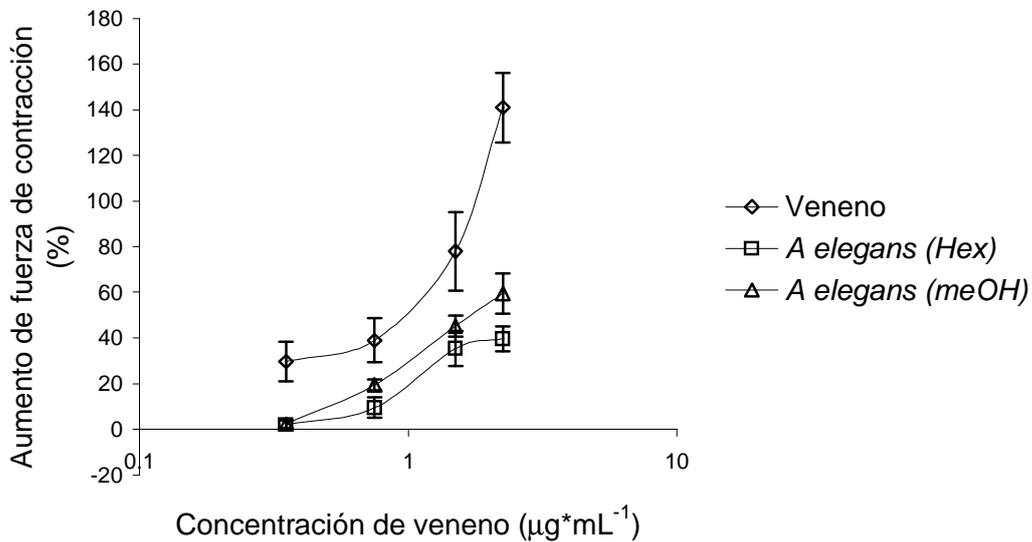
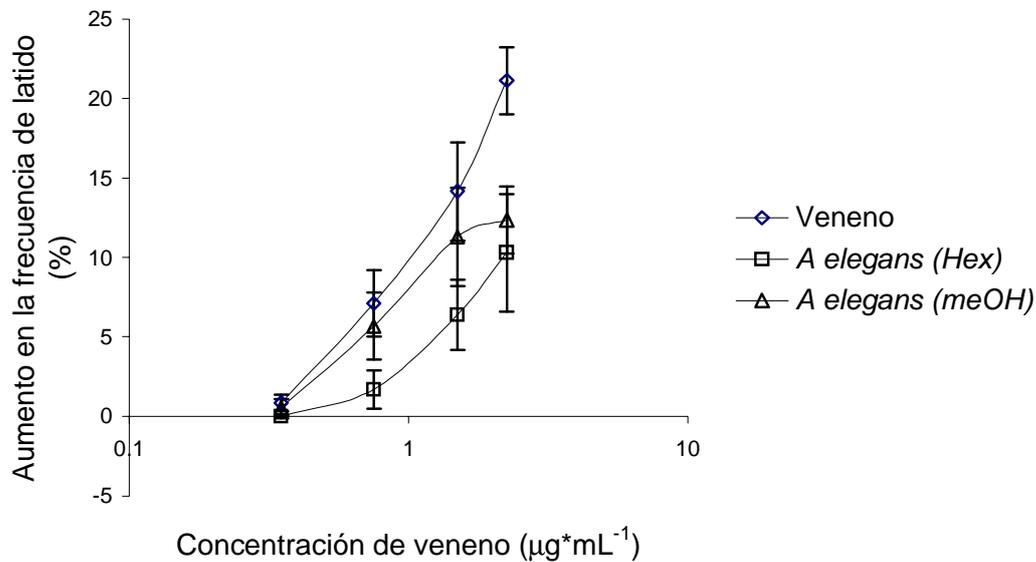


Figura 6. Efecto del extracto hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *A. elegans* sobre el efecto ionotrópico positivo inducido por veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la la contracción espontánea de aurículas aisladas de rata. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  D.E.



**Figura 7.** Efecto del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata (medido como porcentaje de aumento) y en presencia del extracto hexánico (Hex) y metanólico (meOH) de *Aristolochia elegans*. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  D.E.

La adición del veneno a las aurículas aisladas provocó una modificación muy evidente de la forma del trazo de registro, tanto en la altura (fuerza de contracción) como en la amplitud del trazo (frecuencia); la adición de los extractos vegetales antagonizaron el efecto del veneno. Con el fin de hacer mas claro lo anterior se presentan las figuras 8 a 12, que corresponden al trazo en tiempo real de las contracciones espontáneas de aurículas aisladas de rata y bajo el efecto del veneno y extracto hexánico de *B. ternifolia*. En la figura 8 se muestra el registro de un experimento completo. En el trazo se indica el comportamiento basal, el detalle de la arquitectura del trazo se observa en la figura 9. Corresponde al periodo de medición de 0 – 46 segundos, y tiene un promedio de fuerza de contracción de  $0.436 \pm 0.05$  g y una frecuencia de contracción de  $199.8 \pm 3.1$  latidos por minuto

(LPM). En el trazo se observa regularidad tanto en la altura como en el ancho, asimismo, en la arquitectura del trazo.

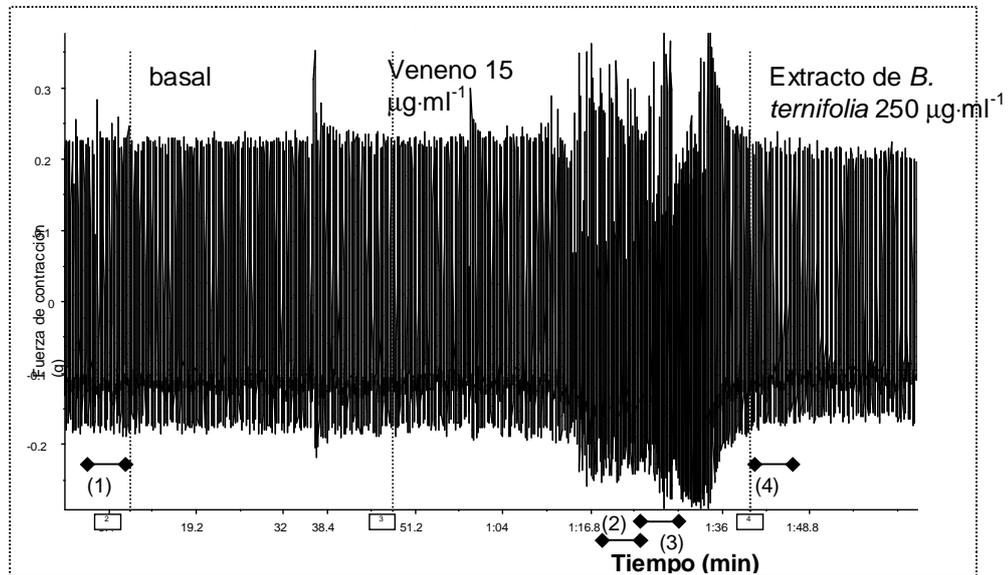


Figura 8. Registro que muestra el efecto producido por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sobre la actividad contráctil de aurículas aisladas de rata, y la administración posterior del extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los números 1, 2, 3 y 4, define los segmentos del registro se amplía en las figuras 9, 10, 11 y 12.

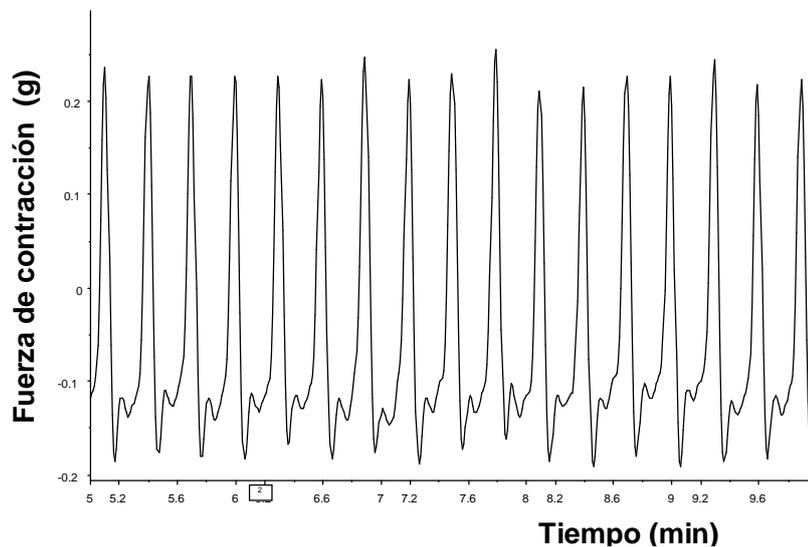
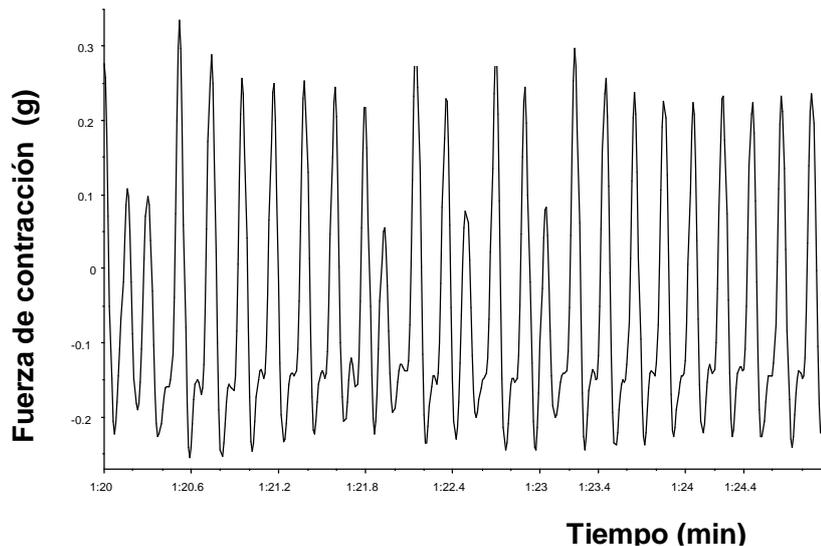
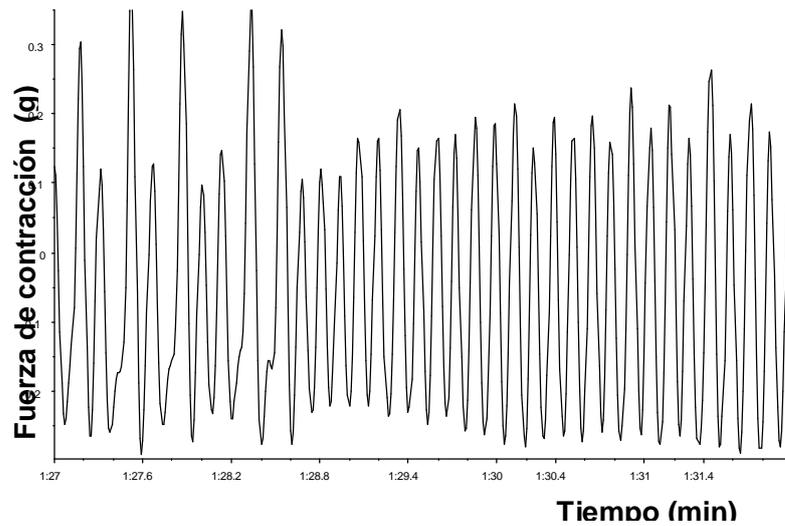


Figura 9. Detalle del registro del comportamiento basal (1 de la figura 8) de la contracción de aurícula de rata. El promedio de contracción fue  $0.436 \text{ g} \pm 0.05$ , la velocidad promedio  $199.8 \pm 3.1 \text{ BPM}$ . El periodo de medición fue de 0 – 46 segundos.

La adición del veneno (15  $\mu\text{g/ml}$ ) en la preparación de aurícula de rata se muestra en la figura 8, que corresponde a 48 seg. Sin embargo, el efecto se ve reflejado claramente hasta los 74 segundos. El promedio de contracción fue  $0.557 \pm 0.12$  g. y la frecuencia  $219.8 \pm 5.8$  LMP, el periodo de medición fue de 48 a 95 seg. Las características del trazo basal se modifican por la aparición de espigas irregulares (figura 9), en las que disminuye la altura y la amplitud, pero sobretodo se modifica la arquitectura. En la figura 11 se observa con detalle como el trazo se vuelve totalmente irregular, que a consecuencia de la disminución de la amplitud del trazo aumenta la frecuencia de contracción.

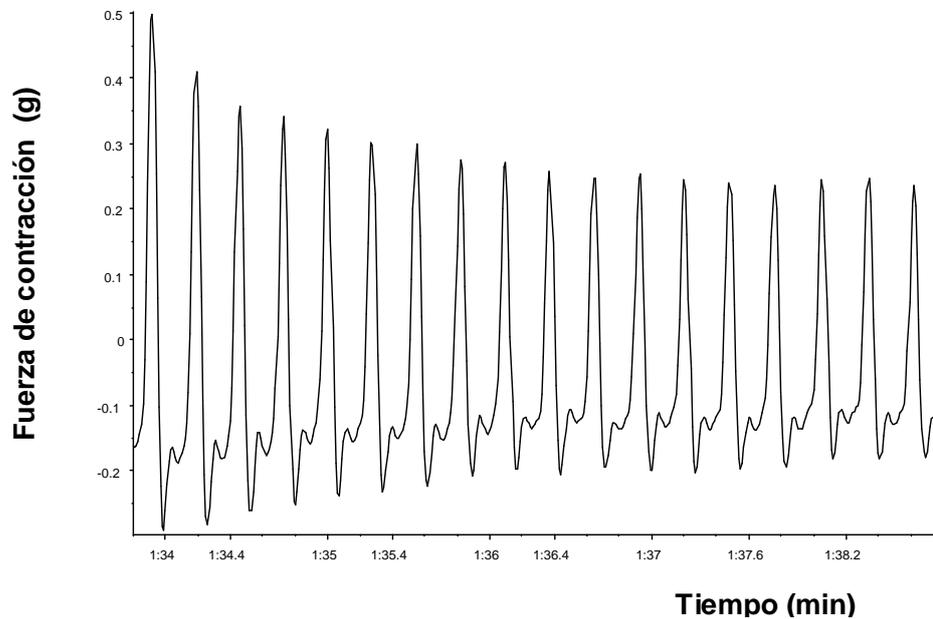


**Figura 10. Detalle del registro del efecto del veneno (15  $\mu\text{g/ml}$ ) (2 de la figura 8) sobre la contracción de aurícula de rata. El promedio de contracción fue  $0.557 \text{ g} \pm 0.12$ . El periodo de medición fue de 48 – 95 segundos.**



**Figura 11. Detalle del registro del efecto del veneno (15  $\mu\text{g/ml}$ ) (3 de la figura 8) sobre la contracción de aurícula de rata. El promedio de contracción fue  $0.557 \text{ g} \pm 0.12$ . El periodo de medición fue de 48 – 95 segundos.**

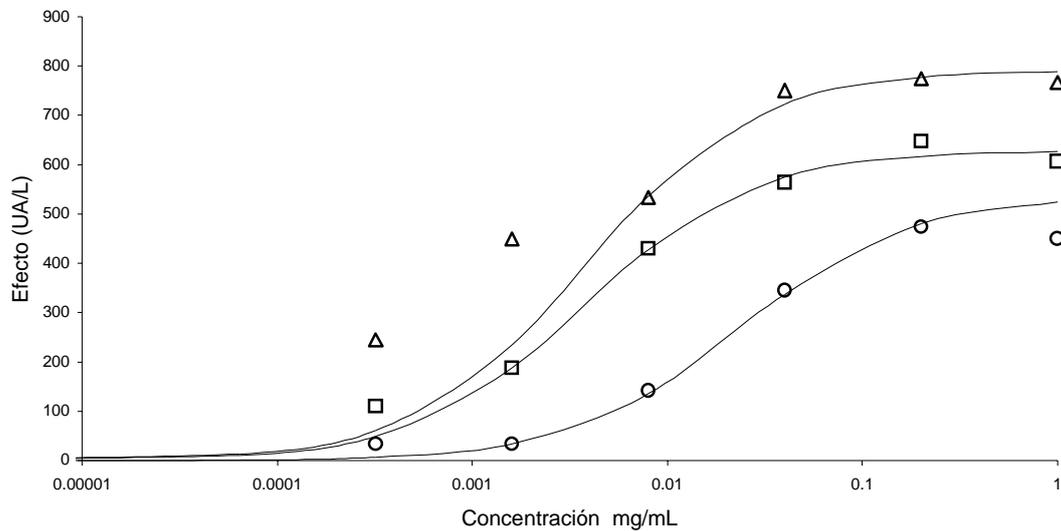
La adición de los extractos vegetales y, en este caso particular el extracto hexánico de *B. ternifolia* ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), restableció la regularidad de las contracciones de las aurículas. El detalle del trazo se observa en la figura 12, el promedio de la fuerza de contracción fue  $0.388 \pm 0.06 \text{ g}$  y la frecuencia  $195 \pm 2.8 \text{ LPM}$ , indicando una recuperación del tejido. El periodo de medición fue de 100 - 124 seg. Se observa también que se restablece la arquitectura del trazo.



**Figura 12. Detalle del registro del efecto del extracto hexánico de *B. ternifolia* (250  $\mu\text{g/ml}$ ) (4 de la figura 8) adicionado en el segundo 100, midiendo la contracción de aurícula de rata. El promedio de contracción fue  $0.388 \text{ g} \pm 0.06$ . El periodo de medición fue de 100 - 124 segundos.**

**Efectos de los extractos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* en la liberación de amilasa inducida por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre el páncreas aislado de ratón.**

El veneno de *Centruroides limpidus limpidus* provocó una liberación de amilasa, dependiente de la concentración, en páncreas aislado de ratón. En este ensayo también se observó que existe una dependencia del tiempo de exposición del tejido al veneno. Los  $E_{\text{max}}$  calculados fueron 537.6, 628.9 y 769.2  $\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}$  para los 5, 10 y 20 min de incubación del páncreas en presencia de veneno.

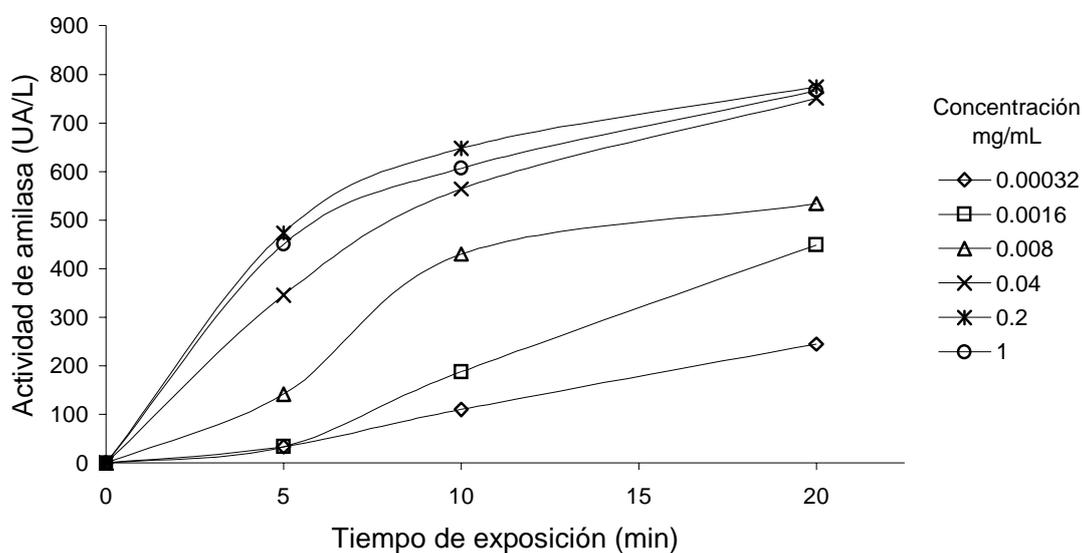


**Figura 13. Curva concentración-respuesta de liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, expuesto a concentraciones crecientes de veneno. Exposición al veneno en diferentes tiempos 5, 10 y 20 minutos (Δ, ◻ y ○). Las  $CE_{50}$  calculadas son: 0.023, 0.00376 y 0.0038 mg/mL respectivamente y los  $E_{max}$  calculados son 537.6, 628.9 y 769.2 UA/L en el mismo orden.**

Las  $CE_{50}$  calculadas fueron: 0.023, 0.00376 y 0.0038  $mg \cdot ml^{-1}$  en el mismo orden. Lo que permitió definir que el tiempo de exposición de 10 min tiene el mismo efecto que a tiempos mayores. En la figura 13 se muestran las curvas de concentración-respuesta, relacionadas con la cantidad de amilasa liberada en presencia de concentraciones crecientes de veneno.

Conforme se permite mayor tiempo de incubación del páncreas aumenta la cantidad de amilasa liberada. Tomando como referencia los 10 min de incubación, se observó (figura 14) que las concentraciones de 0.04, 0.2 y 1  $mg \cdot mL^{-1}$ , presentan un efecto similar y a los 20 minutos los valores de liberación de amilasa

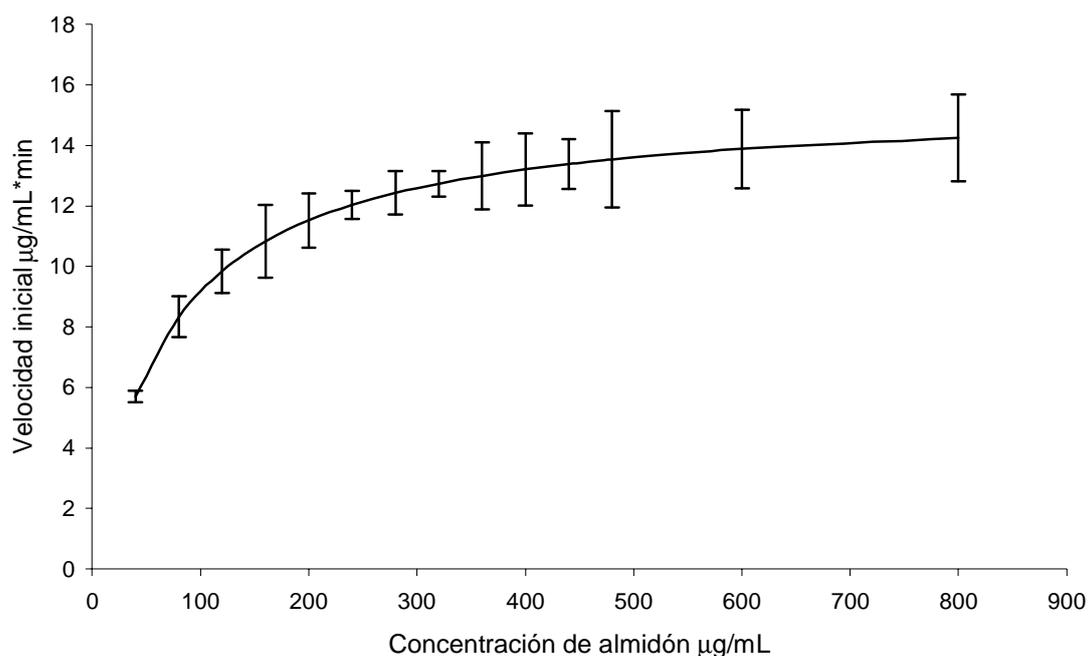
se aproximan más hasta alcanzar prácticamente el mismo valor. Con estos datos se establecieron las condiciones del ensayo para la determinación de la contención de la descarga pancreática por los extractos vegetales, provocada por el veneno de alacrán.



**Figura 14. Velocidad de liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, expuesto a diferentes tiempos: 5, 10 y 20 minutos.**

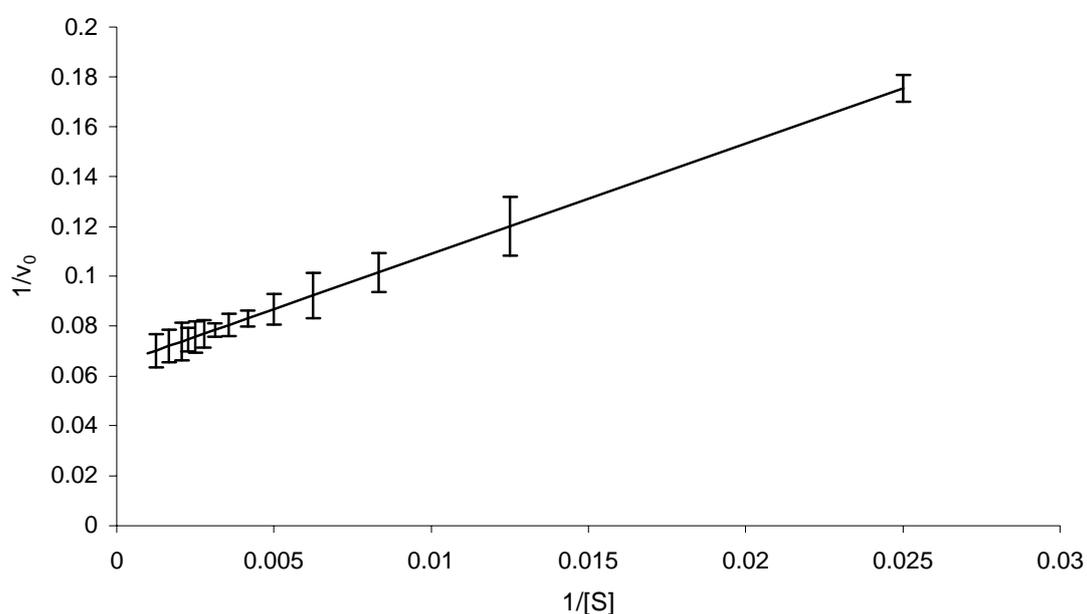
Otro parámetro que se estableció, fue el efecto de los extractos vegetales sobre la actividad hidrolítica de la amilasa, debido a que la actividad de esta enzima se utilizó para evaluar el efecto farmacológico de los compuestos vegetales sobre la capacidad secretagoga del veneno.

Al realizar la determinación de cinética enzimática de almidón en presencia de extractos hexánicos y metanólicos de *A. elgans* y de *B. ternifolia*, se observó que los dos últimos tienen actividad inhibitoria sobre la actividad hidrolítica de amilasa. Por lo que se determinaron las constantes cinéticas e inhibitorias de los extractos de *B. ternifolia*. La relación de la velocidad respecto a la concentración de almidón muestra un comportamiento tipo de cinética de Michaelis-Menten como se observa en la figura 15, la que muestra el promedio de tres determinaciones.



**Figura 15. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, determinada bajo condiciones de laboratorio estipuladas en la metodología. La curva obtenida es el promedio de 3 determinaciones.**

Se calcularon las constantes cinéticas en las condiciones del laboratorio, alcanzando una  $K_M = 68.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $V_{\text{max}} = 15.47 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ , lo anterior se calculó a partir de la transformación de Lineweaver-Burk, mostrada en la gráfica de la figura 16.



**Figura 16. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), para la determinación de las constantes cinéticas de la amilasa pancreática. La línea continua es el ajuste a la recta del promedio de tres determinaciones ( $K_M = 68.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $V_{\text{max}} = 15.47 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ).**

La determinación de la cinética enzimática en presencia de extracto hexánico, mostró una disminución de la velocidad máxima (figura 17). La

transformación de Lineweaver-Burk permitió calcular  $K_{Mapp} = 73.61 \mu\text{g}\cdot\text{ml}$  y  $V_{max i} = 8.025 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$  (figura 18).

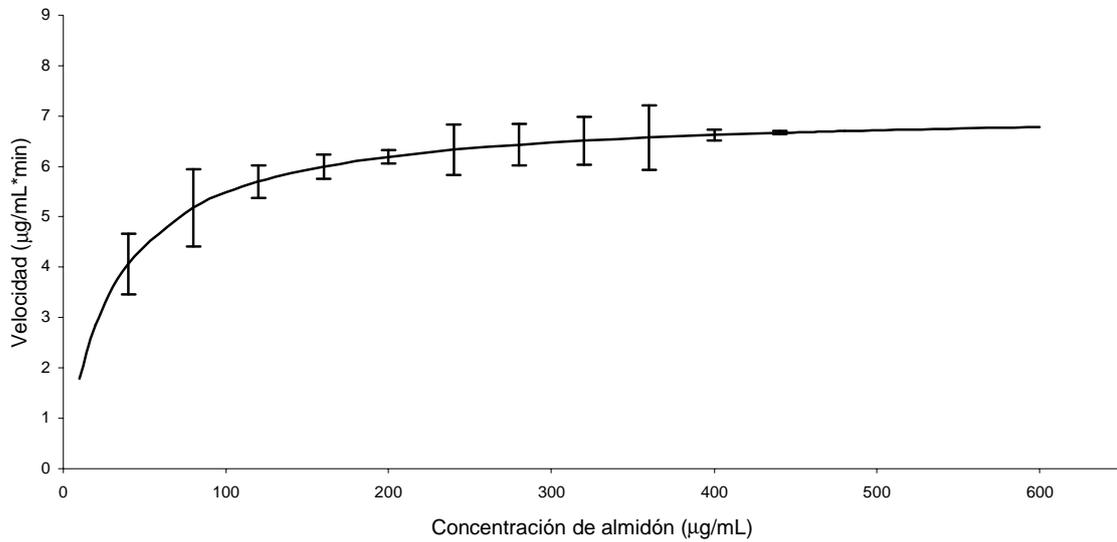


Figura 17. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia de extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia*. La curva obtenida es el promedio de 3 determinaciones.

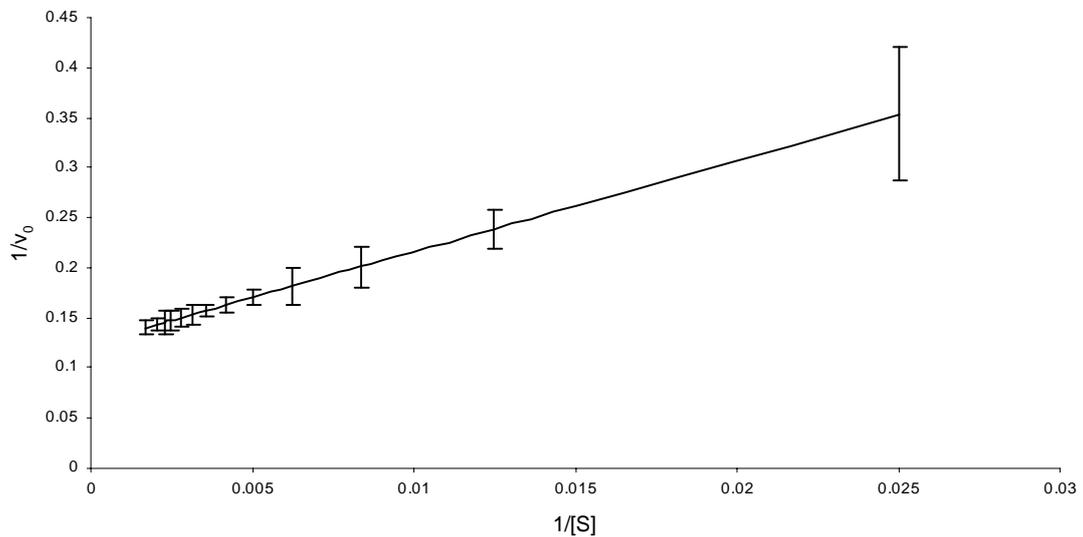
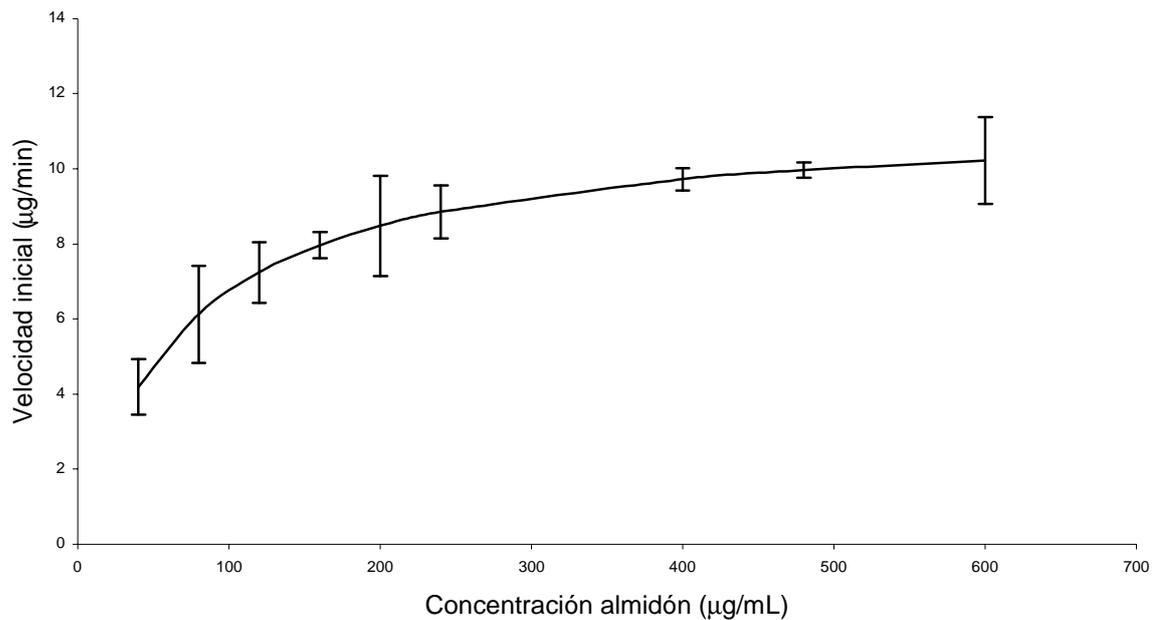


Figura 18. Representación dobles recíprocos (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia*. La línea continua es el ajuste a la recta del promedio de tres determinaciones ( $K_{Mapp} = 73.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $V_{max i} = 8.025 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Respecto al comportamiento cinético de la amilasa en presencia de extracto metanólico, también se encontró una disminución de la velocidad máxima (figura 19).



**Figura 19. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia de extracto metanólico de *Bouvardia ternifolia*. La curva obtenida es el promedio de 3 determinaciones.**

Con la transformación de dobles recíprocas se calculó  $K_M = 68.75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}$  y  $V_{\text{max } i} = 11.39 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$  (figura 20). Al representar en una sola gráfica el comportamiento de las tres rectas, figura 21, se observa que el extracto metanólico se comporta como inhibidor acompetitivo, mientras que el extracto hexánico se comporta como un inhibidor no competitivo.

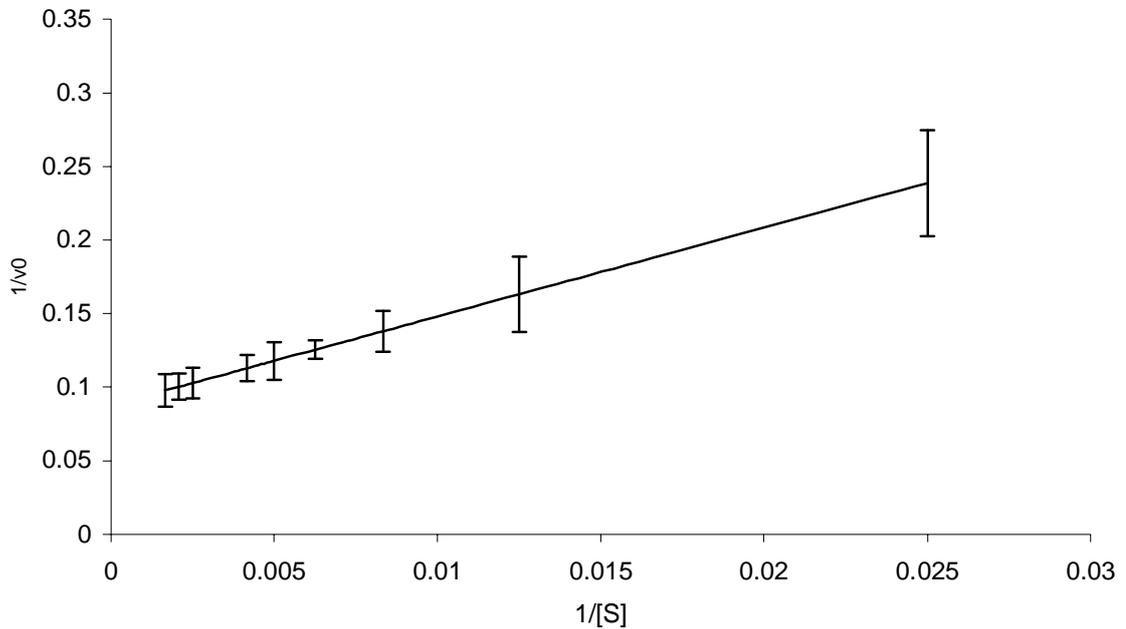


Figura 20. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto metanólico de *Bouvardia ternifolia*. La línea continua es el ajuste a la recta del promedio de tres determinaciones ( $K_M = 68.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $V_{\text{max } i} = 11.39 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

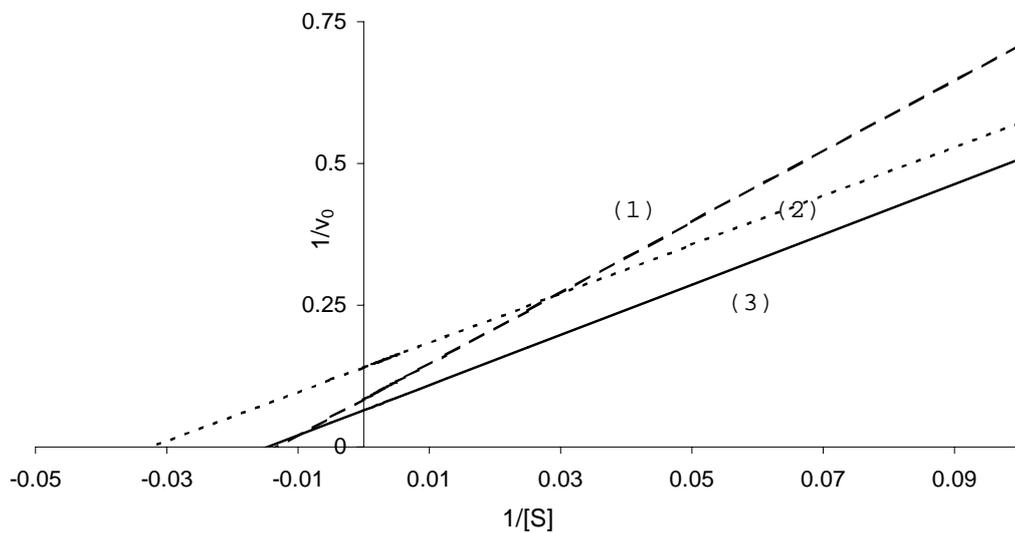
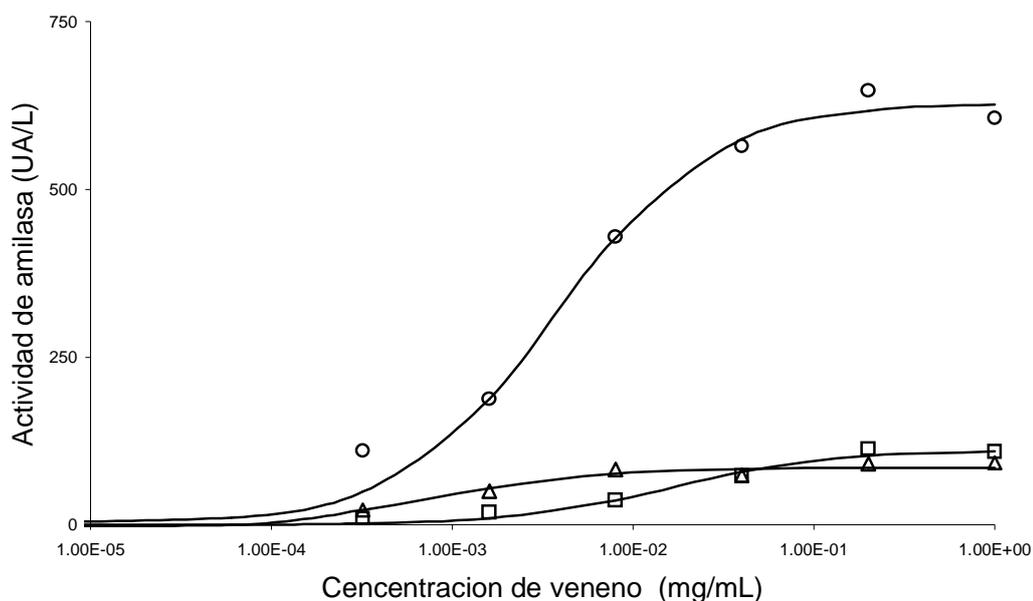


Figura 21. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico (1), extracto metanólico (2) de *Bouvardia ternifolia* comparado y sin extractos (3). En presencia de extracto metanólico y hexánico se presenta 53.88% y 29.26% de inhibición de amilasa.

El efecto secretagogo de amilasa, dependiente de la concentración, provocado por el veneno de alacrán en páncreas aislado fue antagonizado por los extractos vegetales. En el caso de *B. ternifolia* se determinó que la  $CE_{50}$  del veneno aumentó de  $0.000376 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $0.000913 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia del extracto metanólico y con el extracto hexánico se incrementó a  $0.01629 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (figura 22).



**Figura 22.** Se muestra el efecto de los extractos hexánico (□) y metanólico (Δ) de *Bouvardia ternifolia* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón. Las  $CE_{50}$  del veneno (i) solo es:  $0.000376 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; en presencia de extracto metanólico y hexánico los valores de  $CE_{50}$  son:  $0.01629$  y  $0.00913 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente y  $E_{\text{max}}$   $109.34$  y  $84.64 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  en el mismo orden.

Sin embargo, considerando las constantes inhibitorias de los extractos sobre la amilasa (figuras 17 y 19), calculadas como  $K_i = 0.0868$  y  $0.03284$  para el extracto

hexánico y metanólico respectivamente, se debió ajustar el valor de los efectos. De tal forma que los porcentajes de inhibición fueron 36.45 y 9.45%, en el mismo orden. Si el efecto máximo del veneno fue de 626.4 UA·L<sup>-1</sup> y de los extractos hexánico y metanólico fue de 109.34 y 84.64 UA·L<sup>-1</sup> respectivamente, los diferenciales del efecto máximo ( $\Delta E_{\max}$ ) fueron 517.06 y 541.76 en el mismo orden. Aplicando el efecto de la inhibición que se calculó (51.19 y 188.46 UA·L<sup>-1</sup>) al descontar este valor del diferencial del incremento resultó en 328.6 y 490.57 UA·L<sup>-1</sup> para los extractos hexánicos y metanólico de *B. ternifolia* (tabla 4) .

**Tabla 4. Resumen de las constantes cinéticas de amilasa de ratón en presencia de extractos metanólico (MeOH) y hexánico (Hex) de *Bouvardia ternifolia* (Bt).**

	K <sub>M</sub> (μg/ml)	V <sub>max</sub> (μg/ml)	K <sub>i</sub>	%i	CE <sub>50</sub> (mg/ml)	E <sub>max</sub>	ΔE <sub>max</sub>	Efecto i	Efecto neto
Bt <sub>MeOH</sub>	68.75	11.39	0.0328	9.45	9.13x10 <sup>-3</sup>	84.64	541.76	51.19	490.57
Bt <sub>Hex</sub>	73.61	8.025	0.0868	36.45	0.01629	109.34	517.06	188.46	328.6
Veneno					3.76x10 <sup>-3</sup>	626.4			
Amilasa	68.56	13.47							

Los extractos hexánico y metanólico de *A. elegans* mostraron la capacidad disminuir la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, sin embargo, a diferencia de los extractos de *B. ternifolia* no se observó inhibición de la amilasa. Como se muestra en la figura 23, la  $CE_{50}$  del veneno solo fue de  $0.000376 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Con el extracto metanólico y hexánico los valores de  $CE_{50}$  fueron:  $0.0022$  y  $0.0109 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente y los  $E_{\text{max}}$  fueron  $113$  y  $221 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  en el mismo orden.

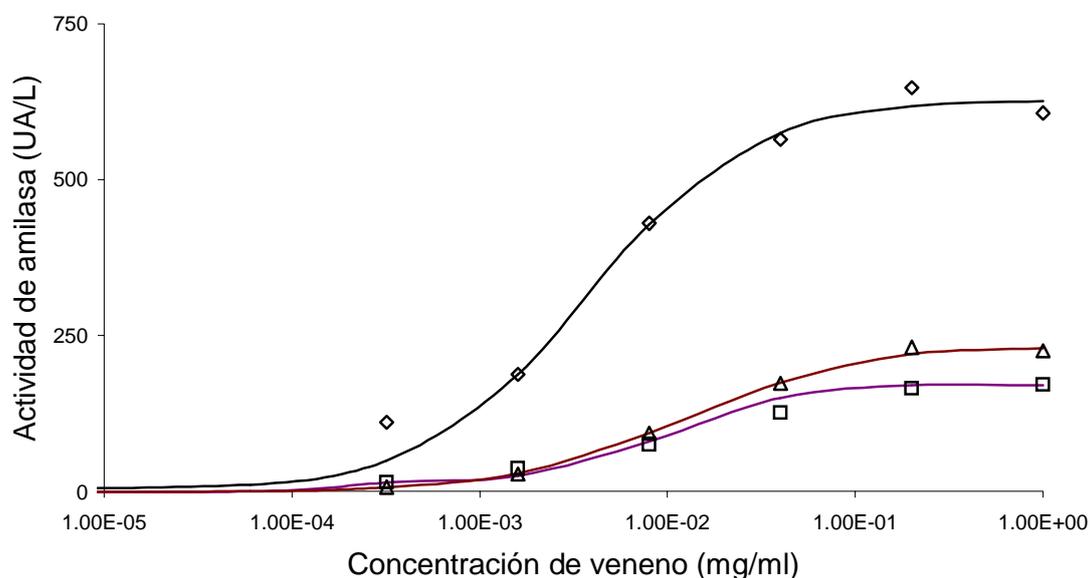
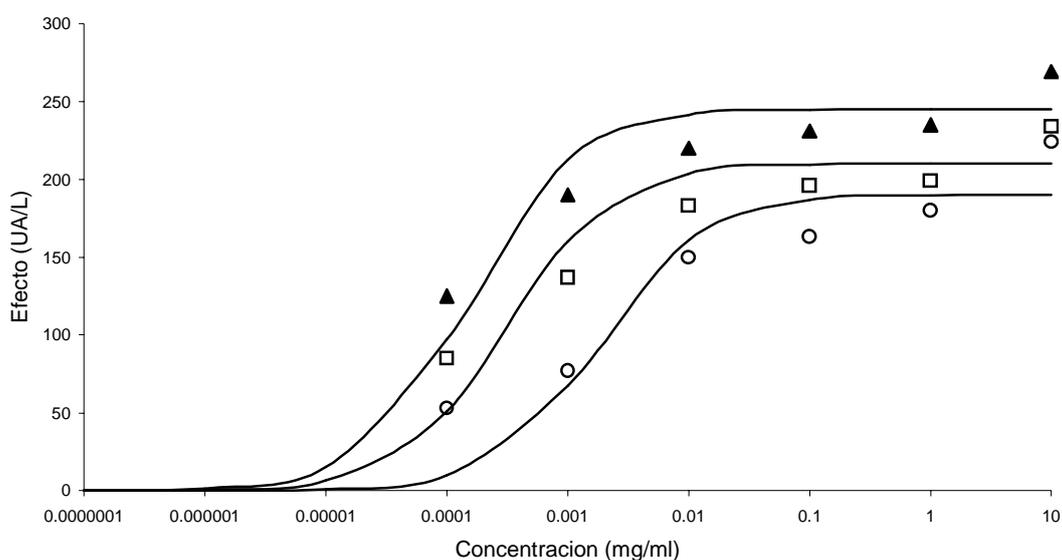


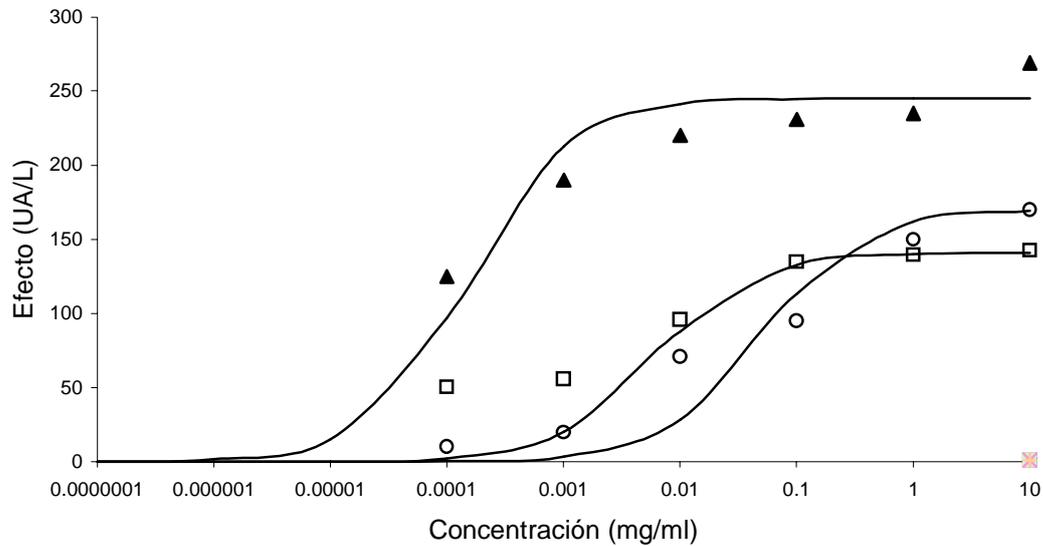
Figura 23. Se muestra el efecto de los extractos hexánico (□) y metanólico (△) de *Aristolochia elegans* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón. Las  $CE_{50}$  del veneno (◇) solo es:  $0.000376 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en presencia de extracto metanólico y hexánico los valores de  $CE_{50}$  son:  $0.0022$  y  $0.0109 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente y los  $E_{\text{max}}$  son  $113$  y  $221 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  en el mismo orden.

Se realizó la determinación de la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón provocada por la adición de carbamilcolina, donde a diferentes tiempos de incubación se establecieron las  $CE_{50}$  en: 0.00015, 0.00019 y 0.0018  $mg \cdot ml^{-1}$  a los tiempos de incubación de 5, 10 y 20 min (figura 24).



**Figura 24.** Curva de concentración-respuesta de liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, expuesto a concentraciones crecientes de carbamilcolina. La exposición al agonista en diferentes tiempos 5, 10 y 20 minutos (▲, ◻ y ○). Las  $CE_{50}$  calculadas son: 0.00015, 0.00019 y 0.0018  $mg \cdot mL^{-1}$  en el mismo orden.

Posteriormente se realizó la determinación del efecto de los extractos sobre la actividad secretagoga de carbamilcolina. La figura 25 muestra el efecto antagónico de los extractos metanólico y hexánico de *B. ternifolia*, y se determinó que los  $CE_{50}$  aumentó de 0.00015  $mg \cdot ml^{-1}$  a 0.006 y 0.05  $mg \cdot ml^{-1}$  respectivamente. Respecto a  $E_{max}$  se estableció una disminución de 245  $UA \cdot L^{-1}$  a 140 y 160  $UA \cdot L^{-1}$  en el mismo orden.



**Figura 25.** Se muestra el efecto de los extractos hexánico y metanólico de *B. ternifolia* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón estimulado con carbamilcolina. Las  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  (S) de la carbamil colina son:  $0.00015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $245 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ ; en presencia de extracto metanólico (□) y hexánico (○) los valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  son:  $0.006 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $140 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $160 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente.

De manera similar se determinó la capacidad de la contención de la descarga pancreática provocada por carbamilcolina de los extractos metanólico y hexánico de *A. elegans* (figura 26). Fijando un aumento de la  $CE_{50}$  de  $0.00015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $0.004$  y  $0.06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente, la  $E_{max}$  se estableció una disminución de  $245 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $190$  y  $175 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  en el mismo orden.

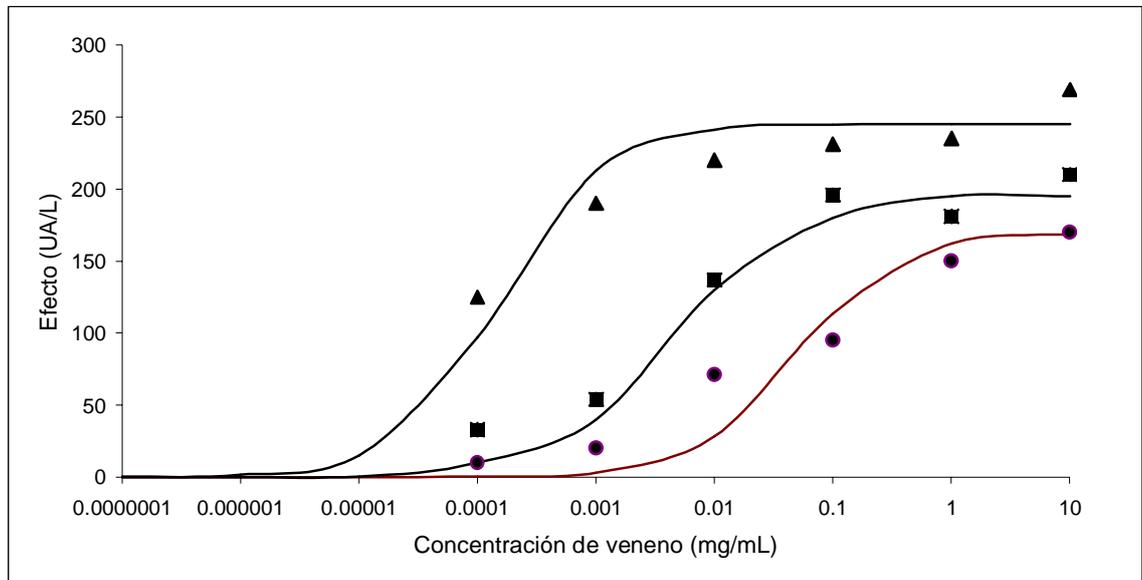


Figura 26. Se muestra el efecto de los extractos hexánico y metanólico de *A. elegans* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón estimulado con carbamilcolina. Las  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  ( $\text{S}$ ) de la carbamil colina son:  $0.00015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $245 \text{ UA/L}$ ; en presencia de extracto metanólico ( $\square$ ) y hexánico ( $\circ$ ) los valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  son:  $0.004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $190 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0.06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $175 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente.

### Evaluación del efecto de los extractos de *Bouvardia ternifolia* en la liberación de amilasa por un método inmunoenzimático.

En el anterior ensayo se observó la capacidad inhibitoria de los extractos de *B. ternifolia* sobre la liberación de amilasa pancreática. Por otro lado, esta actividad enzimática se utilizó como parámetro del antagonismo de los extractos sobre la capacidad secretagoga del veneno de *C. limpidus limpidus*, por lo tanto, para corroborar el efecto de contención de la liberación de amilasa por los extractos de *B. ternifolia* se realizó la medición de amilasa pancreática a través de un anticuerpo específico antiamilasa, por un ensayo inmunoenzimático (ELISA). La amilasa pancreática que se utilizó como inmunógeno fue de origen porcino. Por lo que se realizó una comparación entre las secuencias de aminoácidos de la

amilasa de origen murino y porcino. Previo a la comparación a las secuencias completas se les eliminó el fragmento correspondiente al péptido señal. Se establecieron las secuencias tanto de amilasa porcina como la de ratón con una longitud de 497 aminoácidos. La identidad entre los aminoácidos se determinó en 380 aminoácidos lo que corresponde a 76.5% y la similitud entre aminoácidos, 17.7%, lo que suma un 94.2% de homología entre las secuencias de aminoácidos de las amilasas de ambos orígenes.

Con el análisis de las secuencias fue posible establecer los epitopos que representan los determinantes antigénicos de mayor inmunopotencia. También se pudo establecer tanto la secuencia de aminoácidos del fragmento que presenta mayor índice de hidrofiliidad, sobre el cual se monta la reacción inmunológica, como la ubicación dentro de la secuencia de aminoácidos. En la tabla 5 se presentan los resultados de este análisis.

**Tabla 5. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de origen porcino y murino. La comparación se realizó utilizando el programa de computo PC/GENE. NOTA: La terminación CM indica que es la amilasa porcina madura (sin péptido señal) y la terminación RM indica que la amilasa de ratón madura.**

13-MAY-2002=====CLUSTAL=====PC/GENE

\*\*\*\*\*  
 \* MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT. \*  
 \*\*\*\*\*

Setting of computation parameters

=====

K-tuple value : 1  
 Gap penalty : 5  
 Window size : 10  
 Filtering level: 2.5  
 Open gap cost : 10  
 Unit gap cost : 10

Setting of other parameters

=====

The alignment was done on 12 Protein sequences.

Character to show that a position in the alignment is perfectly conserved: '\*'

Character to show that a position is well conserved: '.'

Alignment

1HX0A158CM	YAPQTQSGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLGPKGFGGVQVSPNENIVV	50
1OSE2098CM	YAPQTQSGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLGPKGFGGVQVSPNENIVV	50
AAF02828CM	YAPQTQSGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLGPKGFGGVQVSPNENIVV	50
1PIF1942CM	YAPQTQSGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLGPKGFGGVQVSPNENVVV	50
ALPGP673CM	YAPQTQSGRTDIVHLFEWRWVDIALECERYLGPKGFGGVQVSPNENVVV	50
AAA37221RM	YDPHTQYGRTAI IHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPNGFAGVQVSPNENIVV	50
CAA24100RM	YDPHTQYGRTAI IHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPNGFAGVQVSPNENIVV	50
CAA24099RM	YDPHTQYGRTAI IHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPNGFAGVQVSPNENIVV	50
AAA37230RM	YDPHTSDGRTAIVHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPKGFQVSPNENVVV	50
CAA24098RM	YDPHTSDGRTAIVHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPKGFQVSPNENVVV	50
NP033799RM	YDPHTSDGRTAIVHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPKGFQVSPNENVVV	50
CAA26413RM	YDPHTSDGRTAIVHLFEWRWVDIA <b>AKECERY</b> LAPKGFQVSPNENVVV	50
	*.*.* **.*.***** *****.*.*.***** **	

1HX0A158CM	TNPSRPWWERYQPVSYKLC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
1OSE2098CM	TNPSRPWWERYQPVSYKLC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
AAF02828CM	TNPSRPWWERYQPVSYKLC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
1PIF1942CM	TNPSRPWWERYQPVSYKLC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
ALPGP673CM	TNPSRPWWERYQPVSYKLC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
AAA37221RM	HSPSRPWWERYQPISYKIC <b>SRSGNEDEF</b> RD	MVNRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
CAA24100RM	HSPSRPWWERYQPISYKIC <b>SRSGNEDEF</b> RD	MVNRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
CAA24099RM	HSPSRPWWERYQPISYKIC <b>SRSGNEDEF</b> RD	MVNRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
AAA37230RM	HNPSRPWWERYQPISYKIC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
CAA24098RM	HNPSRPWWERYQPISYKIC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
NP033799RM	HNPSRPWWERYQPISYKIC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
CAA26413RM	HNPSRPWWERYQPISYKIC <b>TRSGNEDEF</b> RD	MVTRC	NNVGVRIYVDAVINH	100
	.*****.*.*.*.*****.*****.*****.*****			

1HX0A158CM MCGSGAAAGTGTTCCGSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY 150  
1OSE2098CM MCGSGAAAGTGTTCCGSYCNPGSREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY 150  
AAF02828CM MCGSGAAAGTGTTCCGSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY 150  
1PIF1942CM MCGSGAAAGTGTTCCGSYCNPGSREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY 150  
ALPGP673CM MCGSGAAAGTGTTCCGSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY 150  
AAA37221RM MCGVGAQAGQSSTCCGSYFNPNRDFPGVPYSGDFDNDGKCRRTASGGIENY 150  
CAA24100RM MCGVGAQAGQSSTCCGSYFNPNRDFPGVPYSGDFDNDGKCRRTASGGIENY 150  
CAA24099RM MCGVGAQAGQSSTCCGSYFNPNRDFPGVPYSGDFDNDGKCRRTASGGIENY 150  
AAA37230RM MCGAGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEIDNY 147  
CAA24098RM MCGAGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEIDNY 147  
NP033799RM MCGAGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEIDNY 147  
CAA26413RM MCGSGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEISNY 147  
\*\*\* \*..\*\* ..\*\*\*\*\* \*\*..\*..\*\*..\*\*\*\*\*..\*\*\*\*\*..\*\* ..\*..\*\*

1HX0A158CM NDPYQVRDCQLVGLLDLAL**EKDYVR**SMIADYLNKLIIDIGVAGFRIDASKH 200  
1OSE2098CM NDPYQVRDCQLVGLLDLAL**EKDYVR**SMIADYLNKLIIDIGVAGFRIDASKH 200  
AAF02828CM NDPYQVRDCQLVGLLDLAL**EKDYVR**SMIADYLNKLIIDIGVAGFRIDASKH 200  
1PIF1942CM NDPYQVRDCQLVGLLDLAL**EKDYVR**SMIADYLNKLIIDIGVAGFRIDASKH 200  
ALPGP673CM NDPYQVRDCQLVGLLDLAL**EKDYVR**SMIADYLNKLIIDIGVAGFRIDASKH 200  
AAA37221RM QDAAQVRDCRLSGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDASKH 200  
CAA24100RM QDAAQVRDCRLSGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDASKH 200  
CAA24099RM QDAAQVRDCRLSGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDASKH 200  
AAA37230RM NDAYQVRNCRLTGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH 197  
CAA24098RM NDAYQVRNCRLTGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH 197  
NP033799RM NDAYQVRNCRLTGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH 197  
CAA26413RM NDAYQVRNCRLTGLLDLAL**EKDYVR**TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH 197  
. \* . \*\*\* . \* . \* \*\*\*\*\* ..\*\*..\*..\*\*\*\*\*..\*\*..\*\*

1HX0A158CM MWPGDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIKSSEYFGNG 250  
1OSE2098CM MWPGDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIQSSEYFGNG 250  
AAF02828CM MWPGDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIQSSEYFGNG 250  
1PIF1942CM MWPGDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAISSEYFGNG 250  
ALPGP673CM MWPGDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIKSSEYFGNG 250  
AAA37221RM MWPGDIKAILDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAVSSNEYFGNG 250  
CAA24100RM MWPGDIKAILDKQHNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAVSSNEYFGNG 250  
CAA24099RM MWPGDIKAILDKQHNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAVSSNEYFGNG 250  
AAA37230RM MWPRDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIKSEYFGNG 247  
CAA24098RM MWPRDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIKSEYFGNG 247  
NP033799RM MWPRDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIKSEYFGNG 247  
CAA26413RM MWPRDIKAVLDKHLNLTNWFPAWSRPFIFQEVIDLGGEAIKSEYFGNG 247  
\*\*\* \*\*\*\* . \*\* \*\*\*\*\* . \*\* ..\*\*\*\*\*..\*\*..\*\*

1HX0A158CM RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGEWGFMPSDRALVFVDNHDN 300  
1OSE2098CM RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGEWGFMPSDRALVFVDNHDN 300  
AAF02828CM RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGEWGFMPSDRALVFVDNHDN 300  
1PIF1942CM RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGEWGFMPSDRALVFVDNHDN 300  
ALPGP673CM RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGEWGFMPSDRALVFVDNHDN 300  
AAA37221RM RVTEFKYGAKLGKVMRKWDGEKMSYLKNWGEWGLMPSDRALVFVDNHDN 300  
CAA24100RM RVTEFKYGAKLGKVMRKWDGEKMSYLKNWGEWGLMPSDRALVFVDNHDN 300  
CAA24099RM RVTEFKYGAKLGKVMRKWDGEKMSYLKNWGEWGLMPSDRALVFVDNHDN 300  
AAA37230RM RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGEWGLVPSDRALVFVDNHDN 297  
CAA24098RM RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGEWGLVPSDRALVFVDNHDN 297  
NP033799RM RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGEWGLVPSDRALVFVDNHDN 297  
CAA26413RM RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGEWGLVPSDRALVFVDNHDN 297  
\*\*\*\*\* . \* . \* ..\*\*\*\*\*..\*\*..\*\*

1HX0A158CM QRGHGAGGSSILTFWDARLYK--IAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWARNFV 348  
1OSE2098CM QRGHGAGGASILTFWDARLYK--VAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWARNFV 348  
AAF02828CM QRGHGAGGASILTFWDARLYK--VAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWARNFV 348  
1PIF1942CM QRGHGAGGSSILTFWDARLYK--VAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWARNFV 348  
ALPGP673CM QRGHGAGGSSILTFWDA--YRKLVAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWARNFV 348  
AAA37221RM QRGHGAGGASILTFWDARYLK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYWPRNFQ 348  
CAA24100RM QRGHGAGGASILTFWDARLYK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYWPRNFQ 348  
CAA24099RM QRGHGAGGASILTFWDARLYK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYWPRNFQ 348  
AAA37230RM QRGHGAGGSSILTFWDARMYK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWNRNFQ 345  
CAA24098RM QRGHGAGGSSILTFWDARMYK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWNRNFQ 345  
NP033799RM QRGHGAGGSSILTFWDARMYK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWNRNFQ 345  
CAA26413RM QRGHGAGGASILTFWDARMYK--MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWNRNFQ 345  
\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* \* \*\*

1HX0A158CM NGEDVNDWIGPPNNGVVIKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN 398  
1OSE2098CM NGEDVNDWIGPPNNGVVIKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN 398  
AAF02828CM NGQDVNDWIGPPNNGVVIKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVWFRN 398  
1PIF1942CM NGEDVNDWIGPPNNGVVIKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN 398  
ALPGP673CM NGEDVNDWIGPPNNGVVIKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN 398  
AAA37221RM NGKDQNDWVWGPNNNGKTKEVSINPDSTCGNDWICEHRWRQIRNMVAFRN 398  
CAA24100RM NGKDQNDWVWGPNNNGKTKEVSINPDSTCGNDWICEHRWRQIRNMVAFRN 398  
CAA24099RM NGKDQNDWVWGPNNNGKTKEVSINPDSTCGNDWICEHRWRQIRNMVAFRN 398  
AAA37230RM NGKDQNDWIGPPNNGVTKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN 395  
CAA24098RM NGKDQNDWIGPPNNGVTKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN 395  
NP033799RM NGKDQNDWIGPPNNGVTKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN 395  
CAA26413RM NGKDQNDWIGPPNNGVTKEVTINADTTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN 395  
\*\* . \* \*\* .\*\*\*\*\* .\*\* .\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* \*\*

1HX0A158CM VVDGQPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGI VFNNDWQLSSTLQTGLPGGTY 448  
1OSE2098CM VVDGPEFANWWDNGSNQVAFGRGNRGI VFNNDWQLSSTLQTGLPGGTY 448  
AAF02828CM VVDGQPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGI VFNNDWQLSSTLQTGLPGGTY 448  
1PIF1942CM VVDGQPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGI VFNNDWQLSSTLQTGLPGGTY 448  
ALPGP673CM VVDGPEFANWWDNGSNQVAFGRGNRGI VFNNDWQLSSTLQTGLPAGTY 448  
AAA37221RM VVNGQPFANWWDNDSNQVAFGRGNKGLI VFNNDWALSSTLQTGLPAGTY 448  
CAA24100RM VVNGQPFANWWDNDSNQVAFGRGNKGLI VFNNDWALSSTLQTGLPAGTY 448  
CAA24099RM VVNGQPFANWWDNDSNQVAFGRGNKGLI VFNNDWALSSTLQTGLPAGTY 448  
AAA37230RM VVNGQPFANWWDNNSNQVAFSRGNRGI VFNNDWALSATLQTGLPAGTY 445  
CAA24098RM VVNGQPFANWWDNNSNQVAFSRGNRGI VFNNDWALSATLQTGLPAGTY 445  
NP033799RM VVNGQPFANWWDNNSNQVAFSRGNRGI VFNNDWALSATLQTGLPAGTY 445  
CAA26413RM VVNGQPFANWWDNNSNQVAFSRGNRGI VFNNDWALSATLQTGLPAGTY 445  
\*\* . \* \*\* . \* \*\* . \* .\*\*\*\*\* . \* \*\* . \* .\*\*\*\*\* . \* \*\* .\*\*\*\*\* . \* \*\*

1HX0A158CM CDVISGDKVGNSTGIKVVYSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL 495  
1OSE2098CM CDVISGDKVGNSTGIKVVYSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL 495  
AAF02828CM CDVISGDKVGNSTGIKVVYSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL 495  
1PIF1942CM CNVISGDKVGNSTGIKPYVSSDGTAFQFSISNSAQDPFIAIHAESKL 495  
ALPGP673CM CDVISGDKVGNSTGIKVVYSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL 495  
AAA37221RM CDVISGDKVDGNCTGIKVVYVGN DGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKI 495  
CAA24100RM CDVISGDKVDGNCTGIKVVYVGN DGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKI 495  
CAA24099RM CDVISGDKVDGNCTGIKVVYVGN DGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKI 495  
AAA37230RM CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL 492  
CAA24098RM CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL 492  
NP033799RM CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL 492  
CAA26413RM CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL 492  
\* .\*\*\*\*\* . . . \* \*\* . . \* . \* \*\* . \* .\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* . \* \*\* .

Consensus length: 497  
Identity : 380 ( 76.5%)  
Similarity: 88 ( 17.7%)

13-MAY-2002=====PC/GENE

\*\*\*\*\*  
\* PREDICTION OF ANTIGENIC DETERMINANTS \*  
\*\*\*\*\*

### Done on sequence 1HX0A158CM.

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 1.62 : From 75 to 80 : Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.37 : From 136 to 141 : Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys
- ( 3) Ah= 1.37 : From 170 to 175 : Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg

Ah stands for: Average hydrophilicity.

### Done on sequence 10SE2098CM.

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 1.62 : From 75 to 80 : Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.37 : From 136 to 141 : Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys
- ( 3) Ah= 1.37 : From 170 to 175 : Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg

Ah stands for: Average hydrophilicity.

### Done on sequence 1PIF1942CM.

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 1.62 : From 75 to 80 : Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.37 : From 136 to 141 : Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys
- ( 3) Ah= 1.37 : From 170 to 175 : Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg

Ah stands for: Average hydrophilicity.

**Done on sequence AAF02828CM.**

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 1.62 : From 75 to 80 : Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.37 : From 136 to 141 : Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys
- ( 3) Ah= 1.37 : From 170 to 175 : Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg

Ah stands for: Average hydrophilicity.

**Done on sequence ALPGP673CM.**

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 1.62 : From 75 to 80 : Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.37 : From 136 to 141 : Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys
- ( 3) Ah= 1.37 : From 170 to 175 : Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg

Ah stands for: Average hydrophilicity.

**Las próximas secuencias son de amilasa  
pancreática de ratón.**

### Done on sequence **AAA37221RM**.

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 2.08 : From 75 to 80 : Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.75 : From 24 to 29 : Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg
- ( 3) Ah= 1.58 : From 71 to 77 : Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu

Ah stands for: Average hydrophilicity.

### Done on sequence **AAA37230RM**.

Total number of residues is: 492.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 2.08 : From 75 to 80 : Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.75 : From 24 to 29 : Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg
- ( 3) Ah= 1.58 : From 71 to 77 : Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu

Ah stands for: Average hydrophilicity.

### Done on sequence **CAA24100RM**.

Total number of residues is: 495.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 2.08 : From 75 to 80 : Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.75 : From 24 to 29 : Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg
- ( 3) Ah= 1.58 : From 71 to 77 : Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence **CAA26413RM**.  
Total number of residues is: 492.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 2.08 : From 75 to 80 : Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.75 : From 24 to 29 : Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg
- ( 3) Ah= 1.58 : From 71 to 77 : Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence **NP033799RM**.  
Total number of residues is: 492.  
Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.  
The averaging group length is: 6 amino acids.  
-> This is the value recommended by the authors <-

-----

The three highest points of hydrophilicity are:

- ( 1) Ah= 2.08 : From 75 to 80 : Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp
- ( 2) Ah= 1.75 : From 24 to 29 : Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg
- ( 3) Ah= 1.58 : From 71 to 77 : Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Al analizar las seis secuencias de amilasa porcina reportadas (ALPGP673CM, 1HX0A158CM, 1OSE2098CM, 1PIF1942CM, AAF02828CM, ALPGP673CM) [Payan 1980; Pasero 1986; Darnis 1999; Qian 1993; Qian 1994; Qian 1995; Gilles 1996; Larson 1994; Wiegand 1995; Machius 1996] se observó que presentan los mismos determinantes antigénicos establecidos en todos los casos. Un primer fragmento con el mayor índice de hidrofiliidad es el que corresponde a la secuencia: Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-Asp, con un valor de Ah = 1.62 y su ubicación está dentro de la secuencia de aminoácidos de la amilasa pancreática porcina, es del aminoácido 75 al 80. En segundo término, con el mismo valor de hidrofiliidad de Ah = 1.37, se encuentra dos segmentos, el que corresponde a los aminoácidos que van del 136 al 141, con la secuencia Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys, y el fragmento comprendido entre el aminoácido 170 a 175 con la secuencia Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg. En el análisis de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de ratón (AAA37221RM, AAA37230RM, CAA24100RM, CAA26413RM, NP033799RM) [Hagenbuchle 1980; Hagenbuchle 1981; Tosi 1984; Gumucio 1985; Bodary 1985; Schibler 1982], reportados también en la tabla 5, se observó que el fragmento con el mayor índice de hidrofiliidad es la secuencia: Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp, que corresponde al segmento de los aminoácidos del 75 al 80, cuyo valor de Ah = 2.08. En cuanto a la capacidad antigénica hipotética está la secuencia: Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg, que corresponde al segmento que va del aminoácido 24 al 29 con un valor de Ah = 1.75, y finalmente en tercer lugar esta un segmento de siete aminoácidos con una secuencia: Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu, que corresponde a los aminoácidos que van del 71 al 77 con un índice de hidrofiliidad de Ah = 1.58.

Comparando los segmentos de mayor hidrofiliidad de la amilasa pancreática porcina y la de ratón, éstos tienen la misma posición en ambas proteínas, es decir, del aminoácido 75 al 80. Si bien los índices son diferentes ( $A_h = 1.62$  y  $2.08$  porcina y de ratón, respectivamente), la identidad es de 83% (5 de 6 aminoácidos son idénticos), el aminoácido restante es homólogo (asparagina y aspártico en la amilasa porcina y de ratón, respectivamente).

Respecto al segundo segmento con  $A_h = 1.75$  de la amilasa de ratón, éste presenta 83% de identidad con el segmento correspondiente al observado en la amilasa porcina (aminoácidos del 24 al 29). La diferencia contrastante es que la proteína de ratón presenta Lys y la amilasa porcina tiene Leu.

Para realizar la determinación de amilasa por este inmunoensayo enzimático (ELISA), se estableció una competencia de la amilasa fijada en la microplaca y la amilasa liberada en el baño; en el cual se encuentra suspendido el páncreas aislado de ratón. La lectura de la reacción inmunológica se realiza contra una curva estándar (figura 27).

La evaluación del efecto antagónico de los extractos hexánico y metanólico de *B. ternifolia*, sobre la descarga de amilasa del páncreas aislado de ratón, (medido por ELISA) mostró que existe un comportamiento dependiente de la concentración de veneno. La  $CE_{50}$  del veneno se estableció en  $0.00266 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y ésta aumentó a  $0.00221$  y  $0.00915 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia de extracto metanólico y hexánico, respectivamente. Respecto al  $E_{\max}$  se observó una disminución desde  $0.00133 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  provocado por el veneno hasta  $0.000351$  y  $0.000722 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$  en presencia de extracto metanólico y hexánico en el mismo orden (figura 28).

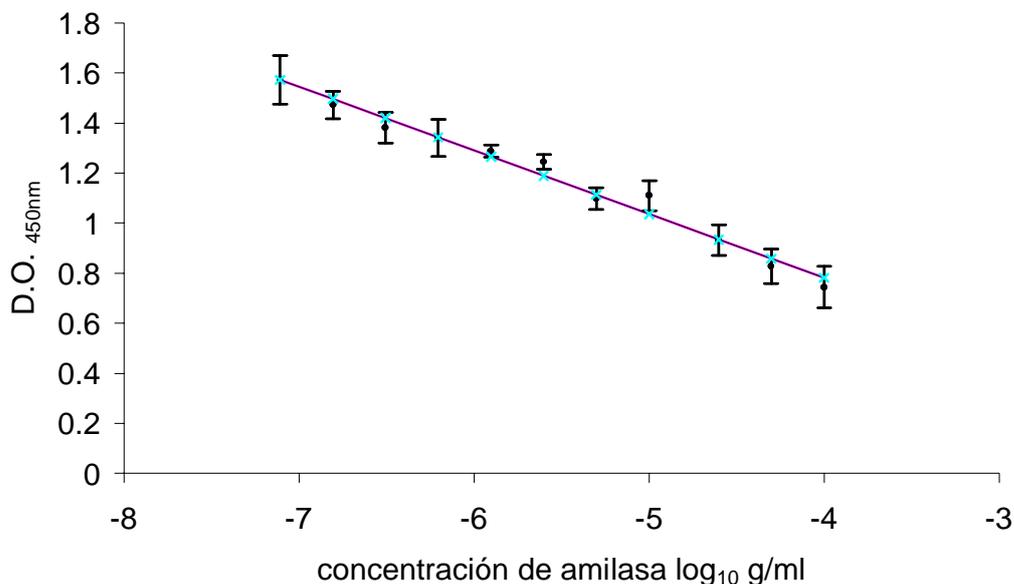


Figura 27. Curva estándar para la determinación de amilasa por el método de ELISA. Ecuación de la recta:  $y = -0.2549(x) - 0.2384$

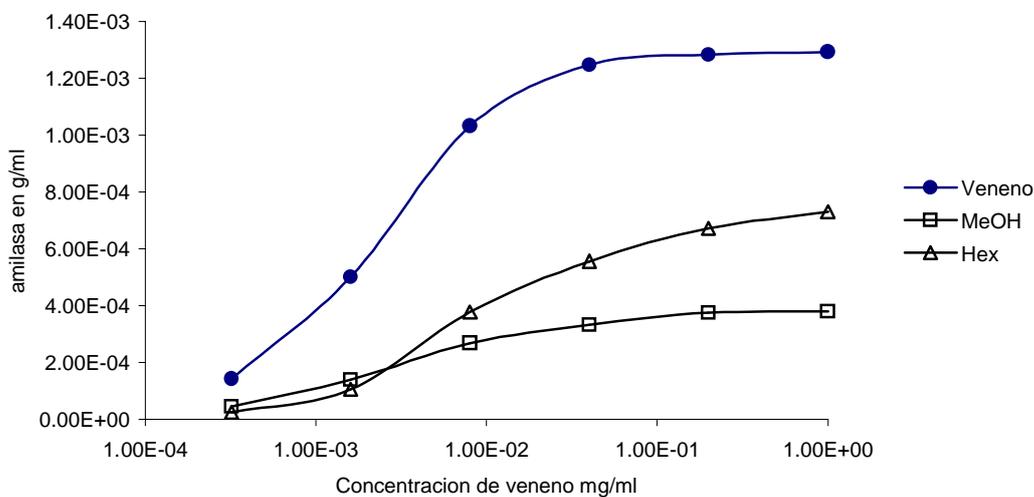


Figura 28. Liberación de amilasa, medida por ELISA, en páncreas aislado de ratón, provocado por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*. Efecto de contención de la descarga pancreática de amilasa por los extractos hexánico (△) y metanólico (□) de *Bouvardia ternifolia*.  $CE_{50}$  fue de  $0.00266 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia de veneno y aumentó a  $0.00221 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  con extracto metanólico y  $0.00915 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  con extracto hexánico,  $E_{\text{max}}$  del veneno  $0.00133 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extracto metanólico fue de  $0.000351 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extracto hexánico fue de  $0.000722 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Inflamación neurogénica del páncreas y el efecto tóxico del veneno de *C. limpidus limpidus* en ratas íntegras y el efecto de los extractos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*.**

En ratas íntegras la administración *i.v.* de veneno de *C. limpidus limpidus* indujo pancreatitis aguda, que se caracterizó por el edema masivo del páncreas y los tejidos retroperitoneales adyacentes. Se cuantificó por la extravasación de la albúmina sérica (observada en el intersticio del páncreas) marcada con azul de Evans, por gramo de tejido en peso fresco. El edema producido por el veneno de alacrán, resultado de un incremento en la permeabilidad vascular, mostró un comportamiento dosis dependiente. En este mismo modelo, el pretratamiento por la vía *i.p.* con los extractos metanólicos y hexánicos de *A. elegans* y *B. ternifolia* redujeron el edema inducido por el veneno. Este efecto fue más importante cuando la dosis más alta del veneno fue administrada ( $500\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), los extractos fueron capaces de reducir significativamente ( $p<0.05$ ) la extravasación del líquido plasmático en aproximadamente 60%. En este modelo no fue posible establecer el efecto máximo, debido a que las dosis mayores de  $500\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  causó la muerte del animal antes de que el periodo de exposición hubiera terminado (figuras 28 y 29).

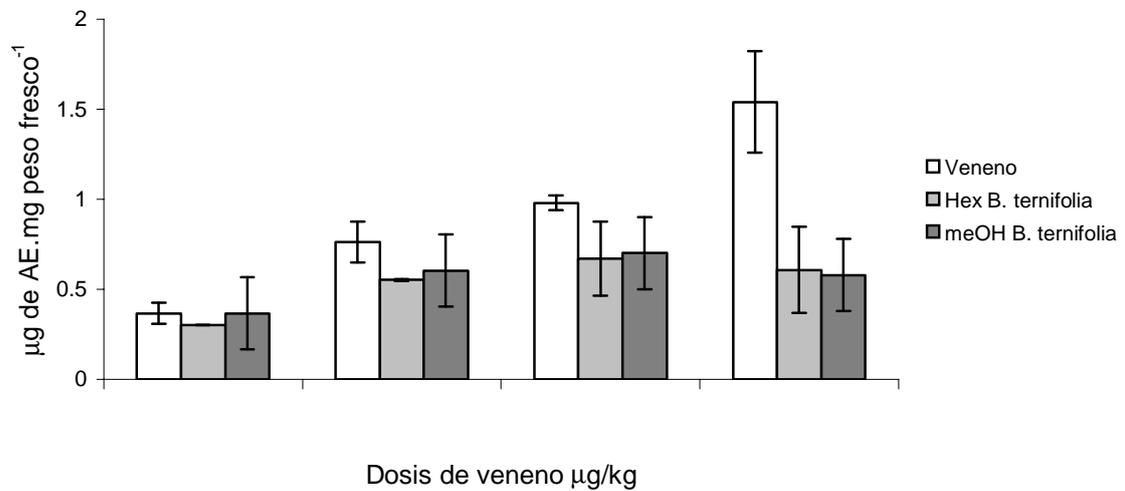


Figura 29. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Bouvardia ternifolia* sobre la extravasación de líquido plasmático en páncreas de ratas intoxicadas con veneno de *C. limpidus limpidus*. Cada barra muestra el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  D.E.

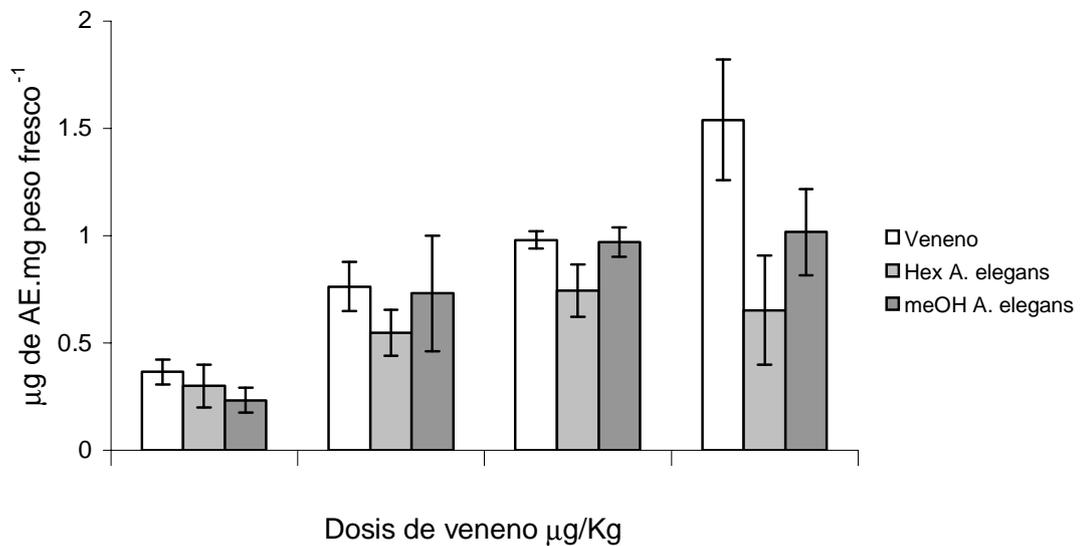


Figura 30. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* sobre la extravasación de líquido plasmático en páncreas de ratas intoxicadas con veneno de *C. limpidus limpidus*. Cada barra muestra el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  D.E.

## DISCUSIÓN.

Dehesa-Dávila y colaboradores (1995) reportaron que la  $DL_{50}$  del veneno de *C. limpidus limpidus* depende de la cepa de ratón; para ésta especie de alacranes se ha establecido entre 0.61 y 3.0 mg/Kg, en este trabajo usando la cepa Balb-C se obtuvo una  $DL_{50}$  de  $0.75 \pm 0.088$  mg/Kg en ratón. Esto apoya el procedimiento experimental, ya que el veneno utilizado en estos experimentos contiene suficiente concentración de las toxinas específicas contra mamíferos, además de ser indicativo de que la especie de alacrán, corresponde a la especie endémica de la región y corresponde a la *Centruroides limpidus limpidus*. En términos generales, los resultados demuestran la efectividad de los extractos vegetales de *Bouvardia ternifolia* y *Aristolochia elegans*, que fueron capaces de disminuir la letalidad del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en ratones. El extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* mostró ser el más potente, aumentó la  $DL_{50}$  en 2.2 veces. Este efecto no es comparable con el antisuero específico, el cual, incrementa la  $DL_{50}$  aproximadamente en 150 veces. No obstante, el extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* contiene una gran variedad de compuestos y es posible incrementar la efectividad de la capacidad antitóxica después de la separación química biodirigida de los compuestos activos. Resultados similares fueron obtenidos con el extracto hexánico de *Aristolochia elegans*, el cual tuvo la capacidad de incrementar la  $DL_{50}$  en 1.38 veces. Por otro lado Matos y col. (1999) ya habían reportado la capacidad del veneno de *Tytius serrulatus* de inducir la contracción del íleon. El veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, al igual que lo reportado para el de *Tytius serrulatus*, provoca una contracción sostenida y reproducible, con

una elevación significativa de la línea basal de tensión, con contracciones periódicas superpuestas. Los autores atribuyen este comportamiento del tejido aislado a la liberación inicial de acetilcolina y la intervención de la sustancia P. Con la administración de los extractos hexánico y metanólicos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*, la contracción producida por el veneno fue inhibida de una manera concentración dependiente, alcanzando una inhibición de alrededor del 70%. Además, las contracciones rítmicas, periódicas superpuestas fueron eliminadas.

Los efectos del veneno observados en las aurículas aisladas de rata, se explican también por la liberación de neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos. El incremento en la frecuencia cardíaca inducida por el veneno fue totalmente inhibida por antagonistas a adreno-receptores  $\beta_1$  o por denervación simpática química con 6-hidroxidopamina. En contraste a estas observaciones el incremento en la fuerza de contracción inducida por el veneno no fue modificado por el bloqueo de adreno-receptores  $\beta_1$  o por denervación simpática química. De tal manera que los efectos cronotrópicos del veneno de *T. Serrulatus* dependen de la liberación de neurotransmisores, pero el efecto inotrópico no depende de la liberación de neurotransmisores. El incremento en la contractibilidad independiente de los neurotransmisores parece ser una acción directa del veneno sobre los cardiomiocitos (Teixeira, 2001). Por lo tanto se fortalece la suposición de la presencia de compuestos antiadrenérgicos en los extractos de ambas plantas. Sin embargo, también se puede especular la presencia de calcio-antagonistas, con base la desaparición del efecto inotrópico positivo, posterior a la

administración de los extractos, en la aurícula intoxicada con veneno de *C. limpidus limpidus*.

Los componentes responsables de la toxicidad del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* reside en tres neurotoxinas específicas que reconocen el canal de sodio y son clasificadas como toxinas del tipo  $\beta$  (Lebreton 1994; Ramírez 1988); también se ha reportado una toxina dirigida contra canal de potasio (Martin 1994). La interacción de la toxina  $\beta$  con el canal de sodio se da por unión al sitio cuatro del canal, la cual es independiente al voltaje y afecta la activación del canal (Jover 1980; Catterall 1996) provocando un incremento de la conductancia del  $\text{Na}^+$ . Con respecto a la toxina específica contra canal de potasio, presenta una concentración  $< 0.1\%$  en relación con las toxinas dirigidas contra el canal de sodio. El veneno de *Centruroides noxius* es el único al que se le han descrito toxinas específicas contra canal de potasio que afecta al humano (Olamendi-Portugal 1996; Nieto 1996). El incremento de la conductancia del canal de sodio produce una liberación masiva de acetilcolina, lo cual puede explicar la mayoría de las manifestaciones clínicas de la intoxicación con veneno de alacrán (Montoya-Cabrera 1996; Ismail 1995).

La disminución de la toxicidad del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* provocada por la administración de los extractos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* puede ser atribuida a la presencia de diferentes compuestos identificados en ambas plantas.

Al menos 29 compuestos químicos han sido identificados en la raíz de *Aristolochia elegans* (Vila 1997). Entre ellos, borneol y acetato de bornilo lo que

puede ser de gran importancia puesto que estos compuestos antagonizan los efectos de la acetilcolina en la médula suprarrenal (Park 2003; Tachikawa 2000), probablemente inhibiendo la liberación masiva de catecolaminas. Al efecto de estos compuestos se adiciona la actividad del  $\beta$ -pineno, el cual, se ha demostrado que posee la actividad relajante en el íleon aislado de cobayo (Sadraei 2001), lo que puede explicar el efecto antagónico del extracto de la *Aristolochia elegans* (Figura 4) sobre las contracciones inducidas por el veneno *Centruroides limpidus limpidus* en el íleon aislado de cobayo. Otros compuestos identificados en la raíz de *Aristolochia elegans* han mostrado actividad antiinflamatoria (Vila 1997) y pueden estar involucrados en el efecto producido por el extracto utilizado:  $\delta$ -cadineno, 1,8-cineole, magnoflorina,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -caryophylleno,  $\beta$ -sitosterol (El-Sebakhy 1984) y ácido aristolóchico (Lenfeld 1986; Santos 2000; Juergens 1998; Santos 2001; Kupeli 2002; Martin 1993; Kuhnt 1993; Mors 2000). Este último presenta la actividad antiinflamatoria por inhibir la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Vishwanath 1987), puesto que la activación de la enzima provoca la liberación de mediadores proinflamatorios que derivan de la hidrólisis de fosfolípidos. También se han identificado en la raíz de *Aristolochia elegans* compuestos que presentan actividad vaso-relajante: magnoflorina (El-Sebakhy 1984; Sotnikova 1997) 1,8-cineole (Vila 1997; Lahlou 2002). Los extractos de *Bouvardia ternifolia* contienen ácido ursólico y oleanólico (Pérez y col. 1998) los cuales poseen actividad anti-inflamatoria (Liu 1995) y podrían estar involucrados en la actividad antitóxica de esta planta. Sobretudo considerando que en los pacientes en estado crítico, por la picadura de alacrán, desarrollan procesos inflamatorios en el páncreas y en el pulmón (D'Suze 1999; Gallagher 1981; Matos 1997; Possani 1991). En el caso de picaduras de

alacranes del género *Tytius* y *Leiurus*, la inflamación aguda del páncreas (secundaria al envenenamiento por picadura de alacrán) forma parte fundamental de la sintomatología de la intoxicación. Sin embargo, hasta la fecha, no se había evidenciado si el veneno del *Centruroides limpidus limpidus*, provoca inflamación aguda del páncreas. De acuerdo con los resultados obtenidos aquí, en el modelo de liberación de azul de Evans en el páncreas de rata intoxicada con veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, se puede asumir que el veneno produce edema agudo de páncreas con un comportamiento dosis dependiente, lo cual representa una considerable contribución a la caracterización toxicológica del veneno del alacrán endémico del estado de Morelos y Guerrero.

Por otro lado, los extractos hexánicos y metanólicos tanto de *Bouvardia ternifolia* como de *Aristolochia elegans*, redujeron el edema pancreático de manera muy evidente a una dosis  $500 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ . En este estudio, se demostró la capacidad secretagoga (de amilasa en páncreas aislado de ratón) del veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, se puede suponer que es debido por la estimulación suprafisiológica asociada con la liberación masiva de acetilcolina, ya que, alrededor del 40% de esta actividad secretagoga fue antagonizada por atropina. El origen del proceso inflamatorio puede ser explicado por la mediación de otras sustancias. En edema agudo de páncreas asociado con el veneno de alacrán, la sustancia P (SP) puede jugar un papel muy importante (Matos 1999). La SP se une a los receptores NK1-R los cuales están unidos a una proteína de las células endoteliales e induce la formación de interrupciones de la continuidad entre las células endoteliales en las vénulas postcapilares (Boewden 1994). La

albúmina y el líquido plasmático permean hacia el espacio intersticial a través de estas interrupciones de la continuidad endotelial, resultando en un edema inflamatorio. Así se explica el edema observado por en este modelo generado por la caruleína, la cual aumenta la permeabilidad vascular (Grady 2000). Los resultados obtenidos demostraron que hay una extravasación de azul de Evans en el intersticio pancreático provocado por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, el cual es ampliamente aceptado como un marcador de desordenes de permeabilidad vascular, asociado con proceso inflamatorio. El proceso inflamatorio fue antagonizado por los extractos de ambas plantas estudiadas, lo cual tuvo concordancia con la capacidad de estos extractos para reducir la cantidad de amilasa liberada en el páncreas aislado de ratón inducido por el veneno de alacrán.

En una evaluación farmacológica, la actividad de una sustancia se describe generalmente en relación con la concentración de la sustancia a la cual se alcanza el efecto máximo, cuando el sistema se encuentra saturado. Sin embargo, en el modelo de páncreas aislado de ratón, se observó que el antagonismo de los extractos de *Bouvardia ternifolia* sobre el efecto secretagogo del veneno, fue enmascarado por la actividad inhibitoria sobre la amilasa de ambos extractos probados. Lo que no sucedió con los extractos de *Aristolochia elegans*. Si se sustrae la inhibición de la amilasa del efecto de contención de la descarga pancreática de amilasa por los extractos de *Bouvardia ternifolia*, podremos observar que el extracto metanólico de *Bouvardia ternifolia* fue más eficiente para contener la descarga pancreática provocada por la exposición al veneno de *Centruroides limpidus limpidus*.

El antagonismo de los extractos de *Aristolochia elegans* y de *Bouvardia ternifolia* sobre la liberación de amilasa provocada por la carbamil colina, mostró que parte de la actividad de los extractos es causada por un mecanismo anticolinérgico, sin embargo, no se puede descartar que existan otros compuestos que actúen disminuyendo la secreción de amilasa por otro mecanismo.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el veneno *Centruroides limpidus limpidus* posee efectos secretagogos de amilasa en el páncreas aislado de ratón, además, que tiene capacidad para desarrollar proceso inflamatorio agudo en el páncreas en rata íntegra; estos efectos son eficientemente antagonizados por los extractos hexánicos y metanólicos de las raíces de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*.

Por otro lado se puede destacar que la pancreatitis aguda, puede ser resultado de múltiples mecanismos los cuales pueden ser contrarrestados por los efectos farmacológicos descritos por los ácidos ursólico y oleanólico (Liu 1995) presentes en el extracto de *Bouvardia ternifolia*. Uno de estos efectos es la capacidad de inhibir la liberación de histamina por las células cebadas (Tsuruga 1991). La histamina incrementa la permeabilidad vascular y promueve el edema asociado a la pancreatitis aguda (Harvey 1987; Dib 2002); este efecto podría explicar la capacidad de los extractos de *Bouvardia ternifolia* para antagonizar el edema producido por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*. Por otro lado, la ciclooxigenasa y lipooxigenasa son dos enzimas inflamatorias, entonces ellos reducen la producción de mediadores proinflamatorios provenientes del ácido araquidónico (Liu 1995). También se ha demostrado que el ácido oleanólico inhibe la síntesis y liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> y leucotrienos B (Simon 1992; Zhou

1993). En la pancreatitis aguda se liberan grandes cantidades de enzimas proteolíticas que producen la autodigestión del tejido pancreático, originando necrosis que constituye una de las más severas complicaciones del padecimiento (Yamaguchi 1989). Tanto el ácido ursólico como el oleanólico presentan constante de inhibición muy similares para la elastasa (4.4 y 6.4  $\mu\text{M}$ , respectivamente) (Ying 1991), este factor puede explicar la capacidad antitóxica del extracto a nivel pancreático. En el modelo de pancreatitis aguda inducida, se ha demostrado el incremento de radicales libres capaces de incrementar la peroxidación de lípidos, lo que constituye parte del mecanismo involucrado en el edema pancreático (Nonaka 1992). Se ha reportado que el ácido oleanólico es un protector muy potente contra la peroxidación, mientras que el ácido ursólico presenta baja capacidad para proteger al miocardio y microsomas del hígado. Pero la combinación de ambos triterpenos amplifica de manera significativa, la protección contra la peroxidación de lípidos (Balanehru 1992). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, podemos suponer que los extractos de *Bouvardia ternifolia* tienen la capacidad de contrarrestar la inflamación pancreática producida por la intoxicación de veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, debido a las múltiples acciones de los ácidos ursólico y oleanólico.

## CONCLUSIONES.

1. La *Bouvardia ternifolia* y la *Aristolochia elegans* tienen actividad antitóxica contra el veneno de alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, al aumentar el valor de la  $DL_{50}$  y antagonizar los efectos del veneno *in vitro* en diferentes modelos experimentales.
2. El veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* tiene la capacidad de inducir el desarrollo de pancreatitis aguda en ratas Sprague-Dawley.
3. La actividad antagónica de los extractos hexánicos y metanólicos de *Bouvardia ternifolia* y *Aristolochia elegans* mostrada en los diferentes modelos experimentales probablemente esta relacionada con acciones anticolinérgicas y antiadrenérgicas.
4. Los extractos hexánicos y metanólicos de *Bouvardia ternifolia* inhiben la actividad enzimática de la amilasa pancreática, mientras que los extractos de *Aristolochia elegans* no modifican esta actividad..
5. Los extractos de *Bouvardia ternifolia* y *Aristolochia elegans* se diferencian a partir de la capacidad inhibitoria de la amilasa pancreática, a pesar de su similitud en la actividad antialacrán; ésto probablemente por su composición fitoquímica diferente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abroug F, El-Atrous S, Nouira S, Haguiga H, Touzi N, Bouchoucha S (1999) Serotherapy in scorpion envenomation: a randomized controlled trial. *Lancet* 354: 906–909.
2. Amaral CFS, Rezende NA, Freire-Maia L (1992) Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am J Cardiol* 71:242-245
3. Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jacquez-López ME (1994) Herbario Medicinal de Instituto Mexicano del Seguro Social. México: 176-177
4. Bablito J, Jover E, Couraud F (1986) Activation of the voltage-sensitive sodium channel by a b-scorpion toxin in rat brain nerve-ending particles. *J Neurochem* 46:1763-1769.
5. Balanehru S, Nagarajan B (1992) Intervention of adriamycin induced free radical damage. *Biochem Int* 28:735-744.
6. Baytelman GB (1980) Etnobotánica en el Estado de Morelos. Metodología e introducción al estudio de 50 plantas medicinales de la zona norte del Estado de Morelos Instituto Nacional de Antropología e Historia, México: 280.
7. Bawaskar HS, Bawaskar PH (1997) Scorpion envenoming and the cardiovascular system. 27:6-9
8. Bodary S, Grossi G, Hagenbuchle O, Wellauer PK. (1985) Members of the Amy-2 alpha-amylase gene family of mouse strain CE/J contain duplicated 5' termini. *J Mol Biol.* 182:1-10.
9. Boewden JJ, Garland AM, Baluk P, Lefevre P, Grady EF, Vigna SR, Bunnett NW, McDonald DM (1994) Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8964-8968.
10. Botems F, Roumestand Ch, Gilquin B, Menez A, Toma F (1991). Refine structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* 254:1521-1523.
11. Brain SD (1997) Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* 37,133-152.
12. Bruix M, Jiménez MA, Santoro J, González C, Colilla FJ, Rico M (1993) Solution structure of 1-H and 1-P thionin from barley and wheat endosperm determined 1H-NMR: structural motif common toxic arthropod protein. *Biochemistry.* 32:715-724.
13. Calderon-Aranda ES, Hozbor D, Possani LD (1993) Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. *Toxicon* 31: 327-337.
14. Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Mealicke A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296:90-91
15. Carlos Faria Santos Amaral, Nilton Alvez Rezende Lineu Freire-Maia (1993) Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am J Cardiol* 71:242-245.

16. Catterall WA (1980). Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:15-43.
17. Catterall WA (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channel. *Annu Rev Biochem* 55: 953-985.
18. Catterall WA (1996). Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr.* 28:219-230.
19. Closa D, Rosello-Catafau J, Hotter G, Bulbena O, Fernández-Cruz L, Gelpi E (1993) Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism in sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats. *Prostaglandins* 45:315-322
20. Corona M, Gurrola GB, Merino E, Cassulini RR, Valdez-Cruz NA, Garcia B, Ramirez-Dominguez ME, Coronas FI, Zamudio FZ, Wanke E, Possani LD. 2002 A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K<sup>+</sup>-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Lett.*532:121-126
21. Cunha-Melo JR, Freie-Maia L., Tafuri WL, Maria TA (1973) Mechanisms de action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. *Toxicon*11:81-84.
22. Dehesa-Dávila M (1986) Avances en el tratamiento farmacológico de la picadura de alacrán. *Salud Pub Mex* 28: 83-91.
23. Dehesa-Dávila M, Alagón A, Possani LD (1995) Clinical toxicology of scorpion sting. In: *Clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Jürg Meir Julian White Ed. CRC Press USA, 221-238.
24. Dehesa-Dávila M, Posanni L. (1994) Scorpionismo and seroterapy in México. *Toxicon.* 32: 1015-1018.
25. D'Suze G, Comellas A, Pesce L, Sevcik C, Sánchez de León R (1999) *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress síndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37:173-180
26. D'Suze G, Corona F, Possani LD, Sevcik C. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 1996; 34(5):591.
27. Darnis S, Juge N, Guo XJ, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Chaix JC. (1999) Molecular cloning and primary structure analysis of porcine pancreatic alpha-amylase *Biochim. Biophys. Acta* 1430:281-289.
28. Diniz CXR, Pimienta AF, Coutinho-Netto J, Pompolo S, Gomez MV, Böhm GM (1974) Effect of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (tityustoxin ) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. *Experientia*;30:1304.
29. El-Sebakhy N, Waterman PG (1984) (-)-(R,R)-7'-O-methylcuspidaline from the leaves of *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* 23:2706-2707.
30. Fletcher M, Possani LD, Fletcher Jr, P (1994) Morphological studies by light and electron microscopy of pancreatic acinar cells under effect of *Tityus serrulatus* venom. *Cell Tissue Res* 278: 255-264.
31. Flores P R (1963) Sintomatología y tratamiento de la picadura de alacrán. *Rev. Inst. Eferm. Trop. (Mex)*, 23,175-179.

32. Fontecilla-Camps JC, Alamassy RJ, Suddath FL, Watt DD, Bugg CE (1980) Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6496-6500.
33. Gallagher S, Sankaran H, Willams JA (1981) Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas. *Gastroenterology* 80:970-973.
34. Gilles C, Astier JP, Marchis-Mouren G, Cambillau C, Payan F. (1996) Crystal structure of pig pancreatic alpha-amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose *Eur J Biochem* 238:561-569
35. Gordon D, Martin-Euclaire MF, Cestele S. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem* 271:8034.
36. Goyffon M, Vachon M, Broglio N (1982) Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon* 20:337
37. Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard N, Bunnett NW y Kirkwood S (2000) Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* 130:505-512.
38. Granja Bermúdez V M, Martínez Zuñiga R, Chico Aldama P. 1999 *Rev Alerg, Asma e Inmunol Pediatr.* 8:109-112
39. Gueron M, Adolph RJ, Grupp IL, Gabel M (1980) Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. *Am J Cardiology* 45:979
40. Gueron M, Ilia R, Sofer S (1992) The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. *J Toxic Clin Toxic.* 30:245-258
41. Gueron M, Sofer S 1994. The role of the intensivist in the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 32:1027-1029.
42. Gumucio DL, Wiebauer K, Dranginis A, Samuelson LC, Treisman LO, Caldwell RM, Antonucci TK, Meisler MH. (1985) Evolution of the amylase multigene family. YBR/Ki mice express a pancreatic amylase gene which is silent in other strains. *J Biol Chem.* 260:13483-13489.
43. Hagenbuehle O, Bovey R, Young RA (1980) Tissue-specific expression of mouse-alpha-amylase genes: nucleotide sequence of isoenzyme mRNAs from pancreas and salivary gland. *Cell* 21:179-187.
44. Hagenbuehle O, Tosi M, Schibler U, Bovey R, Wellauer PK, Young RA. (1981) Mouse liver and salivary gland alpha-amylase mRNAs differ only in 5' non-translated sequences *Nature* 289:643-646
45. Haruna A, Choudhury M (1995) In vivo anti-snake venom activity of a furanoid diterpene from *Aristolochia albida* Duch (*Aristolochiaceae*). *J Pharm Sci* 57: 222-223.
46. Harvey MH, Wedgwood KR, Reber HA (1987) Vasoactive drugs, microvascular permeability, and hemorrhagic pancreatitis cats. *Gastroenterology* 93:1296-1300.
47. Hernández F (1969) Obras completas tomo III. *Historia Natural de la Nueva España*. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico.
48. Ho WZ, Starvropoulos G, Lai JP, Hu BF, Magafa V, Anagnostides S, Douglas SD (1998) Substance P C-terminal octapeptide analogues augment

- tumor necrosis factor-alpha release by human blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmunol* 82:126-132.
49. Hoffman A" El Maravilloso mundo de los arácnidos " Fondo de Cultura Económico: La Ciencia desde México; 1993 No. 116. México D.F.
  50. Hoffmann C y Nieto, R 1939. Segunda contribución al conocimiento de los alacranes mexicanos. *Anales Inst. Biología* 10:83-92.
  51. Huang YB, Fang JY, Hung CH, Wu PC, Tsai YH (1999) Cyclic monoterpene extract from cardamom oil as a skin permeation enhancer for indometacin: in vitro and in vivo studies. *Biol Pharm Bull* 22:642-646
  52. Hutt MJ, Houghton PJ (1998) A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. *J Ethnopharmacol* 60: 97-100.
  53. Instituto Nacional Indigenista (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Ed. México. Vol II, III, 537-538, 691, 1362-1363.
  54. Ismail M (1995) The scorpion envenoming síndrome. *Toxicon* 33:825-858.
  55. Jover E, Couraud E, Rochat H (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1607-1614.
  56. Juergens UR, sober M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T, Vetter H (1998) Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *Eur J Med Res* 17:407-412.
  57. Karnad DR (1998) Haemodynamic patterns in patients with scorpion envenomation. *Heart* 79:485-489
  58. Keegan, L (1980) Scorpions of medical importance. University Press of Mississippi, Jackson, MI. pp 140
  59. Kuhnt M, Probstle A, Rimpler H, Bauer R, Heinrich M (1993) Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Med* 59:533-536.
  60. Kupeli E, Kosar M, Yesilada E, Husnu K, Baser C (2002) A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effect of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish berberis species. *Life Sci* 72:645-657.
  61. Lagunas-Flores A, Rojas-Molina N (1983) Experiencia clínica en 147 niños con picadura de alacrán en Acapulco, Guerrero, Mex. *Rev. Med. IMSS (Mex)* 21,270-275
  62. Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhaes PJ, Leal-Cardoso JH (2002) Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oil, in normotensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80:1125-1131.
  63. Larson SB, Greenwood A, Cascio D, Day J, McPherson A (1994) Refined molecular structure of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 235:1560-1584.
  64. Lebreton F, Delepierre M, Ramírez AN, Balderas C, Possani LD (1994) Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Biochemistry* 33: 11135-11149.

65. Lefkowitz RS, Hoffman BB, Taylor P (1996) Sistemas nerviosos autónomo y motor somático. En: Goodman y Gilman, editor. **Bases farmacológicas de la terapéutica**. México: Mc Graw-Hill-Interamericana; 1996. Vol I, p. 113
66. Lenfeld J, Motl O, Trka A (1986) Anti-inflammatory activity of extracts from *Conyza canadensis*. *Pharmazie* 41:268-269.
67. Liu J (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49:57-68.
68. Lozoya X, Aguilar A, Camacho JR (1987) Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Rev Med IMSS* 25: 283-291.
69. Machius M, Vertesy L, Huber R, Wiegand G. (1996) Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J Mol Biol* 260:409-421.
70. Martin BM, Ramírez AN, Gurrola GB, Nobile M, Prestipino G, Possani LD (1994) Novel K(+)-channel-blocking toxins from the venom of scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. *Karsch. Biochem J* 304: 51-56.
71. Martin S, Padilla E, Ocete MA, Galvez J, Jimenez J, Zarzuelo A (1993) Anti-inflammatory activity of the essential of *Bupleurum frutescens* *Planta Med* 59:533-536.
72. Matos IM, Rocha OA, Leite R, Freire-Maia L (1997) Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rat. *Biochem Physiol* 118C:143-148.
73. Matos IM, Texeira MM, Leite R, Freire-Maia L (1999a) Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. *Eur J Pharm* 368: 231-236.
74. Matos IM, Souza DG, Seabra DG, Freire-Maia L (1999b) Effects of tachykinina NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur. J. Pharmacol* 376:293-300
75. Montoya-Cabrera MA (1996) Alacranismo. *Gac Med Mex* 132: 645-648.
76. Mors WB, DoNascimento MC, Ruppelt-Pereira BM, Pereira NA (2000) Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* 55:627-642.
77. Müller GJ (1993) Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious scorpion envenomations. *S Afr Med J* 83:405 - 7.
78. Murugesan S, Radha Krishna Murthy K, Noronha OPD, Samuel AM (1999) Scorpion venom: Labelling, biodistribution and scintimaging. *Venom. Anim. Toxins*. 5 (1): 35-46
79. Nieto A, Gurrola G, Vaca L, Possani LD (1996) Noxiustoxin 2, a novel K+ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 34: 913-922.
80. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T (1992) Evidence for a role of free radicals by synthesized scavenger, 2-octadecylascorbic acid, in cerulein-induced mouse acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 37:274-279.
81. Olamendi-Portugal T, Gómez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD (1996) A novel structural class of K+-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 315: 977-981.
82. Park TJ, Park YS, Lee TG, Ha H, Kim KT (2003) Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol. *Biochem Pharmacol* 65:83-90

83. Pasero L, Mazzei-Pierron Y, Abadie B, Chicheportiche Y, Marchis-Mouren G (1986) Complete amino acid sequence and location of the five disulfide bridges in porcine pancreatic alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta* 869:147-157.
84. Payan F, Haser R, Pierrot M, Frey M, Astier JP, Abadie B, Duee E, Buisson G (1980) The three-dimensional structure of alpha-amylase from porcine pancreas at 5 angstrom resolution - the active-site location. *Acta Crystallogr B* 36, 416-421.
85. Pérez GRM, Pérez GC, Pérez G S, Zavala S (1998) Effect of triterpenoids of *Bouvardia ternifolia* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine* 5: 475-478.
86. Possani LD, Martin BM, Fletcher MD, Fletcher PL (1991) Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxin purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J Biol Chem* 266:3178-3185.
87. Possani LD, Selisko B, Gurrola GB (1999) Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup>-channels. In *Perspectives in drug discovery*. Kluwer/Escom. Kluwer Academic Publisher. Netherlands, vol 15/16 pp15-40
88. Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E, Payan F. (1994) The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33:6284-6294.
89. Qian M, Haser R, Payan F. (1993) Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 A resolution. *J Mol Biol* 231:785-799.
90. Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E y Payan F (1994) The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33:6284-6294
91. Qian M, Haser R, Payan F. (1995) Carbohydrate binding sites in a pancreatic alpha-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 A resolution *Protein Sci.* 4:747-755.
92. Ramírez AN, Martin BM, Gurrola GB, Possani LD (1988) Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon* 32: 479-490.
93. Rastrelli L, Capasso A, Pizza C, De Tommasi N (1997) New protopine and benzyltetrahydropeotoberberine alkaloids from *Aristolochia constricta* and their activity on isolated guinea-pig ileum. *J Nat Prod* 60:1065-1069.
94. Rogers JC, Qu Y, Tanada TN, Sctheuer T, Catterall WA (1996) Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271:15950.
95. Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Gomez MV, Moraes-Santos T, Brammer MJ, (1994) Tityustoxin-mediated Na<sup>+</sup> influx is more efficient than KCl depolarization in promoting Ca<sup>2+</sup> dependent glutamate release from synaptosomes. *Neurosci Lett* 199:90-92
96. Romi-Lebrun R, Martín-Eauclaire MF, Escoubas P, Wu FQ, Lebrun B, Hisada M, Nakajima T (1997) Characterization of four toxins from *Buthus*

- martensi scorpion venom, which act on apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 245:457
97. Sadraei H, Asghari GR, Hajhashemi V, Kolagar A, Ebrahimi M (2001) Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula humosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine* 2001 8:370-376
  98. Santos FA, Rao VS (2000) Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res* 14:240-244
  99. Santos FA, Rao VS (2001) 1,8-cineole, a food-flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury rats. *Dig Dis Sci* 46:331-337.
  100. Saria A, Lundberg JM (1983) Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods* 8, 41-49.
  101. Schibler U, Pittet AC, Young RA, Hagenbuchle O, Tosi M, Gellman S, Wellauer PK. (1982) The mouse alpha-amylase multigene family. Sequence organization of members expressed in the pancreas, salivary gland and liver. *J Mol Biol.* 155:247-266.
  102. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Epidemiología. Sistema único de información* 2002; 19 (44)
  103. Shivanand D, Hoffman JJ, Torrence SJ, Wiedhopf RM, Cole JR, Arora SK, Bates RB, Gargiudo RL, Kriek GR (1977) Bouvardin y deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J Am Chem Soc* 99: 8040-8044.
  104. Simon A, Najid A, Chulia AJ, Delage C, Rigaud M (1992) Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim Biophys Acta* 1125:68-72.
  105. Sofer S., Shalev H., Weizman Z., Shahak E., Gueron M. 1991. Acute pancreatitis in children following envenomation by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 29,125-128;
  106. Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK (2002) Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1166-1174.
  107. Sotnikova R, Kettmann V, Kostalova D, Taborska E (1997) Relaxant properties of some aporphine alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19:589-597
  108. Tachikawa E, Takahashi M, Kashimoto T (2000) Effects of extracts and ingredients isolated from *Magnolia obovata* thunberg on catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol* 60:433-440.
  109. Teixeira AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CR, Camargos ER, Teixeira MM. (2001) Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle *Toxicon*.39:703-709
  110. Tosi M, Bovey R, Astolfi S, Bodary S, Meisler M, Wellauer PK. (1984) Multiple non-allelic genes encoding pancreatic alpha-amylase of mouse are expressed in a strain-specific fashion. *EMBO J.* 3:2809-2816.

111. Tsuruga T, Chun YT, Ebizuka Y, Sankawa U (1991) Biologically active constituents of *Melaleucas leucadendron* inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem Pharm Bull* 39:3276-3278.
112. Vila R, Mundina M, Muschietti L, Priestap H, Bandoni AL, Adzet T, Cañigüeral S (1997) Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* 46:1127-1129.
113. Vishwanath BS, Appu Rao AG, Gowda TV (1987) Interaction of phospholipase A 2 from *Vipera russelli* venom with aristolochic acid: a circular dichroism study. *Toxicon* 25:939-946.
114. Wiegand G, Epp O, Huber R. (1995) The crystal structure of porcine pancreatic alpha-amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J Mol Biol* 247:99-110
115. World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO offset publication, vol. 58 WHO. Geneva.
116. Yamaguchi H, Kimura T, Mimura K, Nawata H (1989) Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 4:565-571.
117. Yatani A, Kirsch GE, Possani LD, Brown AM. Effects of new world scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *Am J Physiol* 254:443.
118. Ying QL, Rinehart AR, Simon SR, Cheronis JC (1991) Inhibition of human leucocytes elastase by ursolic acid. *Biochem J* 277:521-526
119. Zhou C, Sun X, Liu W, Shi H, Gao H, Miao Y (1993) Effects of oleanolic acid on the immune complex allergic reaction and inflammation. *J Clin Pharm Sci* 2:69-79



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**“EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE ESPECIES  
VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA  
TRADICIONAL MEXICANA CONTRA LA PICADURA DE  
ALACRAN”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas**

**PRESENTA**

**M. en C. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER**

**Director de Tesis: Dr. Rubén Román Ramos  
Co Director de Tesis: Dr. Jaime Tortoriello  
Asesor: Dr. Héctor Ponce Monter**

Abril del 2004