

Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper*

Patricia Saravia-Otten¹, Rosario Hernández¹, José M. Gutiérrez³, Max Mérida², Armando Cáceres²

¹Departamento de Bioquímica, y ²Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

³Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

*Autor al que se dirige la correspondencia: psaravia02@gmail.com

Recibido: 04 de marzo de 2015 / Revisión: 05 de abril de 2015 / Aceptado: 08 de mayo de 2015

Resumen

Se determinó la capacidad de los extractos de seis plantas de uso etnomédico (*Acacia hindsii*, *Aristolochia maxima*, *Cissampelos pareira*, *Hamelia patens*, *Piper peltatum* y *Sansevieria hyacinthoides*) para neutralizar los efectos proteolítico y fosfolipasa A2 (PLA2) del veneno de *Bothrops asper*, la principal especie causante de envenenamiento en el país. Estos efectos, indicadores de la capacidad miotóxica, hemorrágica e inflamatoria del veneno, se evaluaron en ensayos controlados in vitro. Las plantas fueron colectadas, secadas y extraídas por percolación con etanol. Los resultados demuestran que ninguno de los extractos posee actividad PLA2 o proteolítica intrínseca a las dosis estudiadas. Se determinó que tres de los extractos neutralizaron pobremente (< 50%) los efectos estudiados: *S. hyacinthoides* neutralizó 13.90 ± 6.41% del efecto PLA2 y *P. peltatum* y *C. pareira* el 32.98 ± 5.51% y 24.52 ± 7.45%, respectivamente, del efecto proteolítico. Por ello, ningún extracto se evaluó en pruebas de neutralización de la letalidad en ratones. Se concluye que no es recomendable el uso aislado de estas plantas en el tratamiento del envenenamiento por mordedura de *B. asper*, aunque posiblemente las que demostraron alguna actividad puedan resultar potenciadas al usarse en combinación con otras plantas, como se hace en las recetas tradicionales. Dada la complejidad de los componentes del veneno y sus efectos fisiopatológicos, falta investigar la capacidad de las plantas estudiadas para neutralizar las coagulopatías, edema y miotoxicidad producidas durante el envenenamiento.

Palabras claves: Plantas antiofídicas, actividad proteolítica, fosfolipasa A2 (PLA2), veneno de *B. asper*.

Abstract

Many plants are reported to be used in Guatemalan traditional medicine as antidotes against various effects of the snakebite; however, very few attempts have been made to evaluate their neutralizing capacity in controlled experiments. Six plants (*Acacia hindsii*, *Cissampelos pareira*, *Hamelia patens*, *Piper peltatum*, *Sansevieria hyacinthoides* and *Aristolochia maxima*) were evaluated in vitro for their ability to neutralize phospholipase A2 (PLA2) and proteolytic effects of the venom of *Bothrops asper*, the snake responsible for approximately half of the snakebite envenomations in Central America. These effects are indicative of the ability of *B. asper* venom to produce myotoxicity, hemorrhage and inflammation. Plants were collected, dried and extracted by maceration with ethanol. After pre-incubation of several amounts of each extract with a challenge dose of venom, *S. hyacinthoides* demonstrated a low neutralizing capacity (< DE₅₀) of the PLA2 effect (13.90 ± 6.41%); *C. pareira* (32.98 ± 5.51%) and *P. peltatum* (24.52 ± 7.45%) neutralized less than 50% of the proteolytic effect. The results suggest that neither of the tested plants should be used individually to treat the main effects of *B. asper* envenomation. However, the three low-active extracts might be potentiated when used in mixtures composed of several plants, as prepared by traditional healers. Given the complexity of the venom components and the multiple pathologic effects produced by *B. asper* envenomation, more tests are required to fully investigate the ability of these plants to neutralize the coagulant, fibrin(ogen)olytic, edematizing and myotoxic effects of the venom.

Keywords: Plant extracts, proteolytic effect, phospholipase A2 (PLA2), *B. asper* venom.



Introducción

El envenenamiento ofídico es un problema de salud importante a nivel mundial (World Health Organization, 2007). La mordedura de serpiente produce una alta tasa de mortalidad, morbilidad, secuelas físicas como desfiguración o amputación y psicológicas crónicas (Williams et al., 2010), lo que incide en una pérdida importante de productividad por la incapacidad física. Como los trabajadores rurales son el grupo de mayor riesgo, el envenenamiento ofídico tiene un impacto socioeconómico directo sobre las familias y comunidades de los afectados y por lo tanto contribuye al ciclo de pobreza e inequidad prevaleciente (Gutiérrez, Warrell et al., 2013).

La magnitud del problema es difícil de determinar en Centroamérica, ya que por la falta de atención médica y medios de comunicación en las áreas remotas, donde ocurren la mayoría de accidentes ofídicos, se produce un subregistro de datos disponibles. Además, por tradición, en nuestros pueblos indígenas se prefiere utilizar el servicio de herbolarios o curanderos antes de buscar ayuda en centros hospitalarios, lo que los vuelve invisibles en los datos epidemiológicos. En Guatemala, según datos del Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), el número de casos de mordedura de serpiente registrados entre 2001-2010 fue de 7,377 (Morales, 2012).

La serpiente que causa el mayor número de accidentes ofídicos en el país es *Bothrops asper* (Gutiérrez, 2010), que se distribuye en el norte y alguna población aislada en la cuenca del Pacífico (Campbell & Lamar, 1989). El envenenamiento por *B. asper* produce el desarrollo inmediato de daño tisular local caracterizado por edema, dolor, sangrado y necrosis; y en el envenenamiento grave, por hemorragia sistémica, coagulopatías, shock cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez, 2002, 2010). Los principales componentes del veneno, metaloproteinasas y PLA2, son los responsables de las manifestaciones locales y sistémicas que caracterizan al envenenamiento (Angulo & Lomonte, 2009).

En la medicina popular de Guatemala se usan varias plantas contra la mordedura de serpientes (Hay, 2002; Morton, 1977). Estos antídotos se usan para tratar el accidente ofídico en regiones selváticas, donde el acceso inmediato a sueros antiofídicos y atención médica es sumamente difícil. Existen sin embargo muy pocos estudios científicos que validen si dichas plantas o sus

extractos son realmente efectivas en la neutralización del envenenamiento. De determinarse que una o más plantas utilizadas en Guatemala son efectivas, podría mejorarse el tratamiento de emergencia del accidente ofídico, usarse como una alternativa o complemento terapéutico al tratamiento con antisueros. En caso contrario, es importante demostrar las limitaciones de dichas sustancias, para prevenir que el paciente reciba un tratamiento inadecuado con hierbas sin valor curativo o que causen efectos tóxicos.

Con este estudio se retomó la búsqueda de bioactividad en plantas de uso etnomédico para el tratamiento del accidente ofídico en Guatemala. Se evaluaron in vitro los extractos etanólicos de seis plantas usadas como antiofídicos, para neutralizar los efectos PLA2 y proteolítico del veneno, importantes indicadores de su capacidad para producir hemorragia, miotoxicidad e inflamación (Lomonte et al., 2012). Inicialmente se propuso que los dos extractos que demostraran la mayor capacidad neutralizante de uno o ambos efectos in vitro, se evaluarían por su capacidad para neutralizar el efecto letal del veneno en ratones. Sin embargo, ninguno de los extractos estudiados en la primera fase alcanzó la DE_{50} , por lo que no se justifica su evaluación en animales. Se concluye que el uso aislado de las plantas del estudio posiblemente será ineficaz para tratar envenenamientos causados por mordedura de *B. asper*, pero es necesario ampliar el panel de tamizaje con pruebas que determinen la capacidad de las plantas para neutralizar otros efectos del veneno, tales como coagulopatías, edema y miotoxicidad, con el fin de realizar una evaluación completa que permita determinar su potencial efectividad in vivo.

Materiales y métodos

Selección y colecta de especies vegetales

A partir de encuestas de campo, revisión de literatura y bases de datos generadas en estudios anteriores (Saravia, Cáceres, Velásquez, & Lara, 2001), se identificaron 24 especies vegetales de uso popular en el país para el tratamiento de mordedura de serpientes. De estas se seleccionaron seis especies: *Acacia hindsii* Benth, *Aristolochia maxima* Jacq., *Cissampelos pareira* L., *Hamelia patens* Jacq., *Piper peltatum* L. y *Sansevieria hyacinthoides* Druce (Tabla 1), según su disponibilidad, abundancia y capacidad de recolección. La Coleta se realizó en base a un muestreo estratificado, preferencial y por conveniencia en lugares donde se tienen las

Tabla 1.
 Datos de recolección de las plantas del proyecto

Familia / especie (número de registro)*	Nombre común	Parte utilizada	Lugar de colecta Coordenadas y altitud
Rubiaceae / <i>Hamelia patens</i> Jacq. (CFEH 1384)	Chichipín	Hojas	San Bernardino, Suchitepéquez. N 14° 33' 43.5"; W 091° 27' 19.3" 548 msnm**
Asparagaceae / <i>Sansevieria hyacinthoides</i> (L.) Druce (CFEH 1380)	Oreja de burro	Hojas	Guatemala, Guatemala N 14° 34' 48.22"; W 90° 33' 14.23" 1,474 msnm**
Menispermaceae / <i>Cissampelos pareira</i> L. (CFEH 1381)	Alcotán	Raíz	Guatemala, Guatemala N 14° 35' 20.37"; W 90° 29' 56.90" 1,485 msnm**
Piperaceae / <i>Piper peltatum</i> L. (CFEH 1382)	Cordoncillo	Hojas	Morales, Izabal N 15° 26' 32.20"; W 88° 49' 54.10" 46 msnm**
Fabaceae / <i>Acacia hindsii</i> Benth. (CFEH 1383)	Ixcanal	Corteza	San Jacinto, Chiquimula. N 14° 39' 18.20"; W 89° 29' 56.90" 401 msnm**
Aristolochiaceae / <i>Aristolochia</i> sp. (CFEH 1378)	Guaco	Hojas y corteza	Samayac, Suchitepéquez. N 14° 33' 08.2"; W 090° 28' 01.1" 476 msnm**

Nota. *CFEH: *Cemat Farmaya ethnobotanical herbarium*. **msnm: metros sobre el nivel del mar.

especies bajo cultivo o por manejo. Dado que el uso como antiofidico de la mayoría de ellas es común en todo el país, se asume que las especies presentan una composición química similar. La recolección, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios de las buenas prácticas de colecta y el proceso conforme a las técnicas convencionales de secado y molienda (Cáceres, 2009).

Obtención de extractos vegetales

Se prepararon extractos etanólicos por percolación continua según Kuklinski (2000) y el Ministerio de Sanidad y Consumo (2002). Se pesaron 200 g de material vegetal y se agregaron 2,000 ml del disolvente previamente establecido. Esto se colocó en un percolador, se dejó reposar de 24-48 hr y se recogió el 85% del volumen; se colocó más disolvente, se dejó reposar y

se repitió el proceso hasta obtener un volumen similar al doble del peso inicial del material vegetal (fracción diluida). Esta fracción se concentró hasta alcanzar el 15% del volumen y se mezcló con el 85% de líquido obtenido en la primera recolección. La concentración se realizó por medio de rotaevaporador (Harwood & Moody, 1989) a una temperatura no mayor de 45°C. El extracto concentrado se traspasó a un cristizador, se colocó en una desecadora para eliminar el disolvente restante, se pesó y se determinó el porcentaje de rendimiento tomando en cuenta el peso final del extracto seco dividido el material vegetal pesado multiplicado por 100.

Veneno de *B. asper*

Se utilizó una mezcla (*pool*) de veneno colectado en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado,

Universidad de Costa Rica (proporcionado por el Dr. José María Gutiérrez); el cual fue obtenido a partir de al menos 40 especímenes adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica. La mezcla de veneno fue centrifugada, liofilizada y guardada a -20°C hasta su uso. Estudios previos realizados por Saravia, Rojas y colaboradores (2001), demostraron que el perfil toxicológico del veneno de las serpientes de Costa Rica es similar al de las especies guatemaltecas.

Disolución de extractos vegetales

Los extractos vegetales etanólicos de consistencia viscosa grado miel, se disolvieron en una solución tampón de fosfatos (PBS) pH 7.2 utilizando Tween80 como emulsionante (PBS-T80), según el protocolo propuesto por Saravia, Cáceres y colaboradores (2001) con algunas modificaciones. Se pesó la cantidad de extracto en un tubo cónico Falcon y se agregó Tween 80 (5% v/v) y la mitad del volumen final de PBS. Esta mezcla se agitó en vórtex hasta lograr la mayor disolución del extracto; se completó el volumen final con PBS y se calentó a 37°C en baño de María por 30 min, agitando constantemente con una varilla de vidrio. La mezcla fue sometida a sonicación por 15 min y nuevamente calentada a 37°C en reposo. La disolución se centrifugó a 2,500 rpm por 15 min, y el sobrenadante se filtró. El filtrado fue identificado (solución madre o *stock*), alicuotado y almacenado en congelación (-20°C) para su uso posterior.

Actividades PLA2 y proteolítica intrínsecas de los extractos por ensayos dosis–respuesta

Antes de enfrentar el veneno con los extractos vegetales, se midió la actividad PLA2 y proteolítica intrínseca de cada extracto, utilizando ensayos dosis–respuesta, con el fin de determinar los niveles de extracto que podrían utilizarse sin provocar dichos efectos, los cuales invalidarían los resultados de las pruebas de neutralización.

Actividad PLA2 intrínseca

Se incubaron diversas dosis de cada extracto con fosfatidilcolina de la yema de huevo como sustrato. Los ácidos grasos liberados se titularon con NaOH según el método de Dole (1956) con las modificaciones realizadas por Gutiérrez, Lomonte, Chaves, Moreno y Cerdas (1986). Las dosis de los extractos analizados

(1.25, 0.625, 0.312, 0.156 y 0.078 mg) se seleccionaron en base a estudios previos (Saravia, Cáceres et al., 2001). Se colocaron 100 μl de cada dosis en tubos de vidrio de 15 ml y se incubaron por 2 min a 37°C en baño de María. Como blanco se utilizaron 100 μl de PBS–T80 al 5% y como control positivo 100 μl de veneno disuelto en PBS (dosis reto). Se agregó a cada tubo 1 ml de solución fresca de sustrato (yema de huevo en solución tampón, 1:5) y se incubaron por 20 min a 37°C en baño de María. Se agregaron 5 ml de mezcla de alcohol isopropílico, n-heptano, ácido sulfúrico (40:10:1) a cada tubo, se tapó, se agitó vigorosamente en vórtex y se dejó reposar por 10 min. Se agregaron 2 ml de n-heptano y 3 ml de agua destilada a cada tubo, se mezcló y se dejó reposar hasta que se separaron dos fases. Se transfirieron 2 ml de la fase superior de cada reacción a un tubo de ensayo de 10 ml, se agregó 1 ml de la mezcla de titulación (azul de timol al 0.01%) y se mezcló en vórtex. Se tituló cada una de las mezclas agregando volúmenes de 20 μl de NaOH 0.018 N fresco, libre de CO_2 y mezclando en vórtex, hasta observar visualmente un viraje de color amarillo a verde. Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió en tres días diferentes. Se determinó el volumen de NaOH 0.018 N utilizado en la titulación de cada tubo restando el volumen empleado en la titulación del blanco. Se calculó la cantidad de μEq de NaOH utilizados en la titulación y se expresó la actividad PLA2 en $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$.

Actividad proteolítica intrínseca

Debido a que el color verde intenso de los extractos vegetales podría interferir con la prueba colorimétrica, se determinó inicialmente el espectro de absorción de cada extracto a diversas concentraciones (1.25 a 0.039 mg) a cinco longitudes de onda cercanas a 450 nm (400–500 nm). Todos los extractos absorbieron con mayor intensidad a 400 nm, por lo que se incluyó un control interno que permitió restar la absorbancia del color de cada extracto (ruido de fondo). La capacidad proteolítica de los extractos sobre azocaseína se evaluó utilizando una modificación del método de Wang, Shih y Huang (2004). Se prepararon las mismas dosis de cada extracto en PBS pH 7.2. Por dosis de extracto se preparó en un microtubo de reacción una mezcla que contenía 100 μl de solución de sustrato (azocaseína 10 mg/ml en PBS) y 20 μl de extracto (serie X). El control negativo (control Z) contenía 100 μl de solución de sustrato y 20 μl de PBS, y el control positivo contenía 100 μl de solución de sustrato y 20 μl de veneno en

PBS (dosis reto). Para eliminar la interferencia del color de los extractos se preparó un control interno para cada dosis de extracto, el cual contenía 100 μ l de PBS libre de azocaseína y 20 μ l de cada dosis de extracto (serie Y). Para eliminar la absorbancia por el Tween-80 se preparó otro control que contenía 100 μ l de PBS libre de azocaseína y 20 μ l de diluciones seriadas de PBS-T80 (2.5 a 0.078%), que representan el porcentaje de Tween 80 presente en cada dosis de extracto (serie A). Todos se incubaron por 90 min en baño de María. Se agregaron 200 μ l de ácido tricloroacético a cada tubo; se mezclaron en vórtex y se centrifugaron a 4,000 rpm. De cada sobrenadante se transfirieron 150 μ l a una placa de 96 pozos de fondo plano, y se agregó a cada pozo 150 μ l de NaOH 0.5 N. Las placas se mezclaron por agitación y la absorbancia a 450 nm se leyó en un espectrofotómetro. Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió en tres días diferentes.

La actividad proteolítica de cada extracto se calculó de la siguiente manera: A cada ensayo (serie X) se le restó el valor de absorbancia del blanco (control Z) para obtener el valor de absorbancia neta del ensayo. A la absorbancia del control interno (serie Y) se le restó el valor de absorbancia del control de Tween 80 (serie A), para obtener la absorbancia correspondiente al color característico del extracto. Finalmente, al valor de absorbancia neta del ensayo ($X - Z$) se le restó la absorbancia característica de la planta ($Y - A$), obteniéndose así la variación de absorbancia del sobrenadante atribuida a la actividad proteolítica del extracto sobre el sustrato.

Determinación de la dosis reto de veneno

Se determinaron las dosis reto de veneno a utilizar en las pruebas de neutralización que evalúan las actividades proteolítica y PLA2 del lote de veneno, utilizando los ensayos de dosis-respuesta descritos. Se evaluaron varias dosis del veneno para la actividad PLA2 (1.562, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 μ g) y proteolítica (0.78, 3.125, 6.25, 12.5, 18, 25, 50 y 100 μ g) de acuerdo a los ámbitos reportados en estudios anteriores (Gutiérrez, Tsai et al., 2013; Saravia, Rojas et al., 2001). Con los resultados obtenidos se elaboraron gráficas que representan la concentración de veneno vs. μ Eq/mg.min (para ensayo PLA2) o el cambio de absorbancia del sobrenadante a 450 nm (para ensayo de actividad proteolítica). Se determinó la menor concentración de veneno que produjo la máxima actividad estudiada y se eligió como dosis reto la dosis anterior a ésta (dosis sub óptima). Cada

dosis de veneno se evaluó por triplicado, el ensayo se repitió en tres días diferentes.

Pruebas de neutralización de las actividades PLA2 y proteolítica del veneno

Se utilizó el ensayo de pre incubación descrito por Gutiérrez y colaboradores (1990), el cual consiste en incubar la dosis reto del veneno con dosis variables del extracto. La dosis reto de veneno para la actividad PLA2 (3.125 μ g) se enfrentó a dosis variables de extracto a razón veneno: extracto (p/p) de 1:400 hasta 1:12.5. Estas relaciones se seleccionaron para el tamizaje en base a estudios previos (Saravia, Cáceres et al., 2001). Para los ensayos de neutralización de la actividad proteolítica del veneno, la dosis reto (25 μ g) se enfrentó a dosis variables de extracto a razón veneno: extracto (p/p) de 1:50 hasta 1:3.125. Se seleccionó este ámbito en base a los resultados obtenidos en el estudio del espectro de absorción de los extractos vegetales, en donde se determinó que podía leerse sin interferencia la absorbancia del ensayo cuando se utilizan hasta 1.25 mg de extracto. Para cada experimento se prepararon los controles correspondientes según la metodología previamente descrita; las mezclas y controles se incubaron por 30 min a 37°C, al cabo de los cuales se estudió la actividad neutralizante empleando el ensayo dosis-respuesta. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron en tres días diferentes. Los resultados de los experimentos de neutralización se expresaron en términos porcentuales donde el 100% corresponde a la neutralización total del efecto evaluado y el 0% a un efecto de igual magnitud al inducido por el veneno solo. Para establecer el grado de efectividad del extracto se aplicaron los mismos criterios utilizados en un estudio anterior (Saravia, Cáceres et al., 2001) con mínimas modificaciones: neutralización total (100%); neutralización parcial ($\geq 50\%$ (DE_{50}) pero menos del 100%); neutralización pobre (más del 1% pero menos del 50%); ausencia de neutralización (0 - 1%).

Análisis estadístico

El análisis se realizó por un diseño de bloques al azar, para cada planta se analizó PBS 7.2, la dosis reto del veneno (3.125 μ g actividad PLA2, y 25 μ g actividad proteolítica), enfrentados a dosis variables de extracto a razón veneno:extracto de 1:400 hasta 1:12.5

para actividad PLA2 y de 1:50 hasta 1:3.125 para actividad proteolítica. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes (bloques), con tres réplicas por ensayo por conveniencia, para un total de nueve lecturas. Se calculó la actividad intrínseca de cada planta, así como su capacidad neutralizante. Para el ensayo de actividad PLA2 la respuesta se midió como la cantidad de μ equivalentes de NaOH liberados por μ g de proteína por minuto; para el ensayo de actividad proteolítica la respuesta se midió por absorbancia. Los resultados que presentaron algún grado de neutralización fueron evaluados por análisis de varianza de dos vías (ANDEVA), con un nivel de significancia α de 0.05. Para los tratamientos que demostraron diferencias significativas con respecto al control (veneno), se realizó la prueba de Dunnett (comparaciones pareadas).

Resultados

Recolección, secado y obtención de extractos etanólicos de las seis plantas del estudio

De cada planta se colectó la parte que se utiliza tradicionalmente en el tratamiento de la mordedura de serpiente, en los lugares indicados en la [Tabla 1](#). Se

depositó una muestra en el Herbario CFEH del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya y se le asignó un número de registro. El material seco se extrajo con etanol y se concentró, obteniéndose rendimientos del 11 al 37%.

Actividad PLA2 intrínseca de las plantas y pruebas de neutralización

Se midió la actividad PLA2 del veneno por medio del ensayo de dosis–respuesta para determinar la dosis reto (3.125 μ g) a utilizar en los ensayos de neutralización (datos no mostrados). Seguidamente, se midió la actividad PLA2 intrínseca de cada uno de los extractos, demostrándose que ninguno de ellos la presenta a las dosis estudiadas (0.078-1.25 mg). Los ensayos de neutralización del efecto PLA2 del veneno demostraron que *S. hyacinthoides* presentó alguna capacidad neutralizante ([Tabla 2](#)). A pesar de haberse observado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al comparar los valores de neutralización de las dos relaciones veneno-extracto más altas evaluadas (1:400 y 1:200) con la actividad del control de veneno, su capacidad neutralizante es pobre, ya que no logró alcanzar la dosis efectiva media (DE_{50} , relación veneno: extracto

Tabla 2.

Evaluación de la actividad PLA2 intrínseca de los extractos vegetales etanólicos y su capacidad neutralizante

Planta (extracto etanólico)	Actividad fosfolipasa A2 intrínseca ^a (μ Eq/mg.min)	Neutralización de la actividad fosfolipasa A2 del veneno ^b (%)
<i>Hamelia patens</i> (hoja)	0	0
<i>Aristolochia maxima</i> (corteza)	0	0
<i>Aristolochia máxima</i> (hoja)	0	0
<i>Piper peltatum</i> (hoja)	0	0
<i>Sansevieria hyacinthoides</i> (hoja)	0	13.90 \pm 6.41 ^c
<i>Acacia hindsii</i> (corteza)	0	0
<i>Cissampelos pareira</i> (raíz)	0	0

Nota. ^aLa actividad PLA2 intrínseca de los extractos etanólicos se evaluó incubando diferentes dosis de cada extracto (0.078 – 1.25 mg) con el sustrato y titulando los ácidos grasos liberados.

^bNeutralización: se preincubaron dosis variables de extractos (1: 400 hasta 1: 12.5 p/p) con una dosis fija de veneno (dosis reto (DR): 3.125 μ g) antes de exponerlas al sustrato, posteriormente se determinó la cantidad de ácidos grasos liberados en comparación con el control (DR de veneno). ^cLos números indican el porcentaje de neutralización obtenido con el mayor nivel de extracto utilizado. Los resultados se presentan como el promedio \pm DS (n = 9) de tres ensayos independientes realizados en triplicado.

que neutraliza el 50% del efecto del veneno) (Bogarín et al., 1995; Gutiérrez et al., 1990).

Actividad proteolítica intrínseca de las plantas y pruebas de neutralización

Se midió la actividad proteolítica sobre azocaseína del veneno por medio del ensayo de dosis-respuesta para determinar la dosis reto (25 µg) para los ensayos de neutralización (datos no mostrados). Como se muestra en la Tabla 3, ninguno de los extractos etanólicos mostró actividad proteolítica intrínseca a las dosis estudiadas. En las pruebas de neutralización se encontró que los extractos de *P. peltatum* y *C. pareira* mostraron alguna capacidad para neutralizar la actividad del veneno. *P. peltatum* mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar los valores de neutralización de las primeras tres relaciones veneno: planta (1:50, 1:25 y 1:12.5) con la del control de veneno; *C. pareira* mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para las primeras dos relaciones evaluadas (1:50 y 1:25); sin embargo, ninguna de estas alcanzó la DE_{50} .

Discusión

En Guatemala la serpiente que causa el mayor número de accidentes ofídicos es *Bothrops asper* (Gutiérrez, 2010). La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento recomendado para contrarrestar el envenenamiento (Gupta & Peshin, 2012; Gutiérrez, 2010), pero su uso en áreas rurales presenta serias limitaciones en cuanto a accesibilidad y riesgo de reacciones alérgicas severas. Los antisuecos son altamente eficaces en la neutralización de los efectos sistémicos producidos por el veneno, pero su efecto es pobre sobre los daños locales (como se citó en Lomonte, León, Angulo, Rucavado, & Núñez, 2009). Dado que la mayoría de accidentes ofídicos suceden en áreas rurales alejadas de los centros de salud, un número indeterminado de víctimas de envenenamiento ofídico son tratados por curanderos o chamanes con plantas, de acuerdo a sus recetas tradicionales (Coe & Anderson, 2005; Orellana, 1987; Otero, Fonnegra et al., 2000).

Por ello, se plantea la necesidad de validar científicamente si las plantas utilizadas en estos antídotos son

Tabla 3.

Evaluación de la actividad proteolítica intrínseca de los extractos vegetales etanólicos y su capacidad neutralizante.

Planta (extracto etanólico)	Actividad proteolítica intrínseca ^a	Neutralización de la actividad proteolítica del veneno ^b (%)
<i>Hamelia patens</i>	0	0
<i>Aristolochia maxima</i> (corteza)	0	0
<i>Aristolochia máxima</i> (hoja)	0	0
<i>Piper peltatum</i>	0	24.52 ± 7.45 ^c
<i>Sansevieria hyacinthoides</i>	0	0
<i>Acacia hindsii</i>	0	0
<i>Cissampelos pareira</i>	0	32.98 ± 5.51 ^c

Nota. ^aLa actividad proteolítica intrínseca de los extractos vegetales se determinó incubando diferentes dosis de extractos (0.039-1.25 mg) con azocaseína. La cantidad de los productos de degradación del sustrato se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 450 nm.

^bNeutralización: se preincubaron dosis variables de extractos con una dosis fija de veneno (dosis reto (DR): 25 µg) y se realizó el procedimiento descrito para la determinación de la actividad proteolítica. Las relaciones DR : extracto (p/p) ensayadas fueron de 1:50 hasta 1:3.125.

^cLos números indican el porcentaje de neutralización obtenido con el mayor nivel de extracto utilizado. Los resultados se presentan como el promedio ± DS (n = 9) de tres ensayos independientes realizados en triplicado.

realmente efectivas en la neutralización de los venenos de las serpientes del país, lo que contribuiría a disminuir o retardar los efectos locales y sistémicos del envenenamiento ofídico en el lugar del accidente, mientras se obtiene tratamiento médico.

En la medicina popular de Guatemala se usan varias plantas contra la mordedura de serpientes (Morton, 1977). Aunque existen personas especializadas en este tipo de tratamientos, se ha reportado que no existe un criterio común en cuanto a las recetas, preparación, dosificación o administración de los antídotos (Hay, 2002; Saravia, Cáceres et al., 2001). Previamente se estudió la capacidad de los extractos etanólicos y acuosos de *Dorstenia contrajerva*, *Neurolaena lobata* y *Eupatorium odoratum* para neutralizar los efectos del veneno de *B. asper*. Algunos demostraron una capacidad neutralizante pobre del efecto hemorrágico e intermedia del efecto coagulante, pero fallaron en neutralizar los efectos PLA2 y letal del veneno (Saravia, Cáceres et al., 2001).

Con el fin de dar continuación a los estudios de validación de las plantas utilizadas como antiofídicos en Guatemala, se estandarizaron dos técnicas de tamizaje in vitro para la detección de actividad antifosfolipasa A2 y antiproteolítica de los extractos etanólicos de seis plantas medicinales utilizadas en el país.

Las PLA2 forman parte de los principales componentes tóxicos del veneno de *B. asper* (Angulo & Lomonte, 2009). Estas despliegan una amplia variedad de actividades farmacológicas, como miotoxicidad, cardiotoxicidad, anticoagulación y edema. Por esta razón, se han realizado esfuerzos en la búsqueda de compuestos naturales que logren la inhibición de la actividad PLA2 de los venenos de serpiente de forma rápida, sin producir los efectos secundarios de los antiseros (como se citó en Carvalho et al., 2013).

El efecto proteolítico del veneno de *B. asper* está mediado principalmente por metaloproteinasas dependientes de zinc (*snake venom metalloproteinases*, SVMPs) y en menor proporción por serinaproteinasas (Gutiérrez, 2002). Estas enzimas son responsables de algunas de las consecuencias más comunes de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, como el sangrado local y sistémico, el cual contribuye a la lesión tisular permanente en el tejido muscular, así como a hipovolemia y choque cardiovascular (Gutiérrez, 1995). Se ha demostrado que las SVMPs también inducen mionecrosis, edema, formación de bulas, dermonecrosis, fibri(noge)nólisis y degradación de la matriz extracelular (Gutiérrez, 2002; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez, Rucavado, Chaves, Díaz, & Escalante, 2009).

Por ello, los inhibidores de las metaloproteinasas del veneno no se limitan a reducir los efectos locales sino que además previenen las complicaciones secundarias al envenenamiento al disminuir la hemorragia. Varios estudios han reportado metabolitos vegetales que son inhibidores de las SVMPs de diversas especies ofídicas, entre ellas *Pentacletra macroloba* y *Baccharis trimera*, que inhiben las actividades hemorrágica y proteolítica del veneno de las serpientes *Bothrops* (como se citó en Santhosh et al., 2013).

Debido a que el contenido y la potencia del veneno podría variar por factores como el tamaño de la serpiente, edad, clima, última ingesta y procedencia geográfica (Gutiérrez, 1995), fue necesario determinar las actividades PLA2 y proteolíticas del lote de mezclas de veneno utilizado para este estudio antes de establecer las dosis reto. Los resultados mostraron curvas de actividad enzimática similares a las reportadas previamente (Gutiérrez, Tsai et al., 2013; Saravia, Rojas et al., 2001), por lo que para las dosis reto se seleccionaron dosis de veneno que indujeran una respuesta sub-máxima, ubicada en una porción lineal de la curva de dosis-respuesta, que produjera el efecto farmacológico estudiado pero sin saturar el sistema de cuantificación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de neutralización demostraron que únicamente el extracto de *S. hyacinthoides* logró una neutralización pobre ($< DE_{50}$) del efecto PLA2 del veneno. Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente en el estudio de plantas guatemaltecas (Saravia, Cáceres et al., 2001), en donde no se logró detectar actividad PLA2 en los extractos estudiados.

En el caso del extracto de *P. peltatum* este resultado fue inesperado, ya que aunque en nuestro sistema no mostró poseer actividad neutralizante en ninguna de las relaciones veneno: extracto investigadas, un estudio realizado en Costa Rica por Nuñez y colaboradores (2005), demostró que inhibía completamente in vitro la actividad PLA2 de la miotoxina I, aislada del veneno de *B. asper*. Sin embargo, el compuesto activo aislado (4-nerolidilcatecol), no logró inhibir la actividad PLA2 en experimentos posteriores in vivo. Igualmente, existen reportes que sugieren propiedades anti-inflamatorias de varias especies de *Aristolochia* (Aristolochiaceae), debidas en parte a su capacidad para inhibir la actividad de las enzimas PLA2 en general (Heinrich, Chan, Wanke, Neinhuis, & Simmonds, 2009; Sosa et al., 2002). Las diferencias observadas en los resultados pueden atribuirse a aspectos metodológicos, ya que en el caso del estudio de Nuñez y colaboradores (2005) los ensayos

se realizaron con una toxina aislada y los extractos de las especies de *Aristolochia* citados anteriormente no fueron expuestos al veneno crudo.

En un estudio de tamizaje realizado en Colombia por Otero, Nuñez, Jiménez y colaboradores (2000), se mostró que nueve de 74 extractos investigados neutralizaron efectivamente in vitro el efecto hemolítico indirecto, indicador de la actividad PLA2 del veneno de *B. atrox* (ahora clasificado como *B. asper*) (como se citó en Lomonte et al., 2009). Aunque las dosis de los extractos etanólicos que alcanzaron la DE_{50} (0.044-1.153 mg) son comparables a las de nuestro estudio, Otero, Nuñez y colaboradores (2000) reportaron que el efecto fue dosis-dependiente, por lo que existiría la posibilidad de que al aumentarse las dosis en nuestras pruebas de tamizaje, se incrementa su capacidad neutralizante. Sin embargo, por tratarse de cantidades muy altas del extracto consideramos que elevar estas dosis no tendría mucho sentido, pero que existe la posibilidad de que al utilizarse en combinación con otras plantas el efecto pueda potenciarse, como se discute más adelante en esta sección.

El análisis de la capacidad de los extractos para neutralizar el efecto proteolítico del veneno demostró una actividad pobre de *P. peltatum* y *C. pareira*, ya que ninguna llegó a neutralizar el 50% de actividad enzimática del veneno. Debe mencionarse que los niveles de los extractos etanólicos y las relaciones veneno: extracto (p/p) que se usaron en este estudio abarcaron ámbitos más amplios a los reportados por otros investigadores en Colombia para neutralizar el mismo efecto del veneno de *B. asper* (Otero, Nuñez, Barona et al., 2000; Patiño, López, Aristizábal, Quintana, & Benjumea, 2012). Aunque podría esperarse que este efecto también fuera dosis-dependiente, no fue posible aumentar la cantidad de extracto etanólico para el ensayo utilizado en el tamizaje, pues se alcanzó su solubilidad máxima a los niveles ensayados. Dado que el color natural de los extractos fue una limitante en el ensayo descrito por Wang y colaboradores (2004), se evaluará la posibilidad de utilizar un ensayo diferente para medir la neutralización de la actividad proteolítica en futuros proyectos. Una metodología diferente podría permitir resultados más precisos con extractos vegetales, por lo que no puede descartarse la posibilidad que *P. peltatum* y *C. pareira* inhiban el efecto hemorrágico del veneno, el cual es mediado por metaloproteinasas (Castro et al., 1999). En este contexto, los resultados obtenidos anteriormente con tres plantas nativas (Saravia, Cáceres et al., 2001) demostraron que los extractos de *D. contrajerva* (etanólico) y *N. lobata* (acuoso) fueron

capaces de neutralizar, aunque pobremente, el efecto hemorrágico del veneno de *B. asper*.

Estudios realizados en América del Sur han encontrado extractos vegetales con capacidad neutralizante de la actividad proteolítica del veneno de *B. asper* o sus toxinas aisladas, utilizando plantas nativas de Brasil y Colombia principalmente (Borges et al., 2000, 2001; Núñez et al., 2004; Pereañez et al., 2008). Aunque se han encontrado varias plantas con actividad neutralizante de este veneno, pocos trabajos reportan el aislamiento y caracterización de moléculas activas, tales como las macrobinas (saponinas triterpenoides) (da Silva et al., 2007).

De acuerdo a las nuevas políticas que restringen el uso de animales de laboratorio (Dothel, Vasina, Barbara, & de Ponti, 2013; Nuffield Council on Bioethics, 2005a, b), inicialmente se propuso que los extractos que demostraran mayor capacidad neutralizante de uno o ambos efectos in vitro, se evaluarían en cuanto a su capacidad neutralizante del efecto letal del veneno en ratones. A la luz de los resultados descritos, ninguno de los extractos etanólicos calificó para los ensayos in vivo.

En conclusión, los extractos de *S. hyacinthoides*, *P. peltatum* y *C. pareira* demostraron una pobre capacidad neutralizante de los efectos estudiados del veneno, por lo que el análisis global de los resultados cuestiona seriamente el uso, al menos de forma individual, de estas plantas para el tratamiento de envenenamientos por mordedura de *B. asper*. Es importante señalar que en el estudio anterior, a pesar que las plantas no presentaron capacidad para neutralizar los principales efectos del veneno, los extractos de *D. contrajerva* demostraron actividad coagulante intrínseca. Asimismo, los extractos de *N. lobata* y *E. odoratum* tuvieron actividad anticoagulante intrínseca, así como una capacidad neutralizante parcial del efecto coagulante (y probablemente la actividad desfibrinogenante) del veneno (Saravia, Cáceres et al., 2001). Estos hallazgos plantean la posibilidad que las plantas del presente estudio posean los metabolitos necesarios para neutralizar los efectos del veneno sobre la homeostasia, el cual produce desfibrin(ogen)ación (incoagulabilidad) y hemorragia sistémica (Barrantes, Solís, & Bolaños, 1985; Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009; Rucavado et al., 2005). Por esta razón, se requiere la implementación de más pruebas de tamizaje antifídico que permitan evaluar otros efectos del veneno que permitan establecer la potencial actividad de los extractos vegetales para neutralizar los efectos fisiopatológicos del veneno de *B. asper*.

Las posibilidades de detectar plantas de uso etnomédico en Guatemala con una mayor capacidad

neutralizante del veneno también se verán aumentadas conforme se incrementa el número de extractos a investigar. Por ejemplo, en el trabajo realizado en Colombia por Otero, Nuñez y colaboradores (2000) se muestra que únicamente 12 de los 74 extractos investigados neutralizaron la letalidad, y de ellos solo nueve presentaban actividad PLA2. En Costa Rica, Castro y colaboradores (1999) estudiaron 48 especies vegetales, de las cuales solo 10 extractos demostraron actividad antihemorrágica. Por ello debe continuarse con la realización de encuestas etnobotánicas encaminadas no solo a la detección de plantas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de mordeduras de serpiente, sino para conocer de forma más detallada las dosis y recetas tradicionales utilizadas en el país. Es posible que los extractos de las plantas no tengan un efecto significativo cuando se utilizan de forma individual, pero podrían potenciarse en combinación con otras, lo cual vendría a explicar que tradicionalmente los antidotos están compuestos de la mezcla de varias plantas (de Moura et al., 2014; Hay, 2002; Martz, 1992).

Agradecimientos

Agradecemos a Nely Marroquín y Marcella Orellana, por su entusiasta participación en el desarrollo del proyecto; así mismo a Licda. Nereida Marroquín, Dra. Sully Cruz y Lic. Federico Nave por asesoría. Se agradece la cofinanciación por la Dirección General de Investigaciones (Digi) dentro del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud (partida presupuestal 4.8.63.1.72) y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Usac, Guatemala.

Referencias

- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54, 949-957.
- Barrantes, A., Solis, V., & Bolaños, R. (1985). Alterations in the coagulation mechanisms of patients bitten by *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*, 23, 399-407.
- Borgarín, G., Segura, E., Durán, G., Lomonte, B., Rojas, G., & Gutiérrez, J. M. (1995). Evaluación de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de *Bothrops asper* (terciopelo) de Costa Rica. *Toxicon*, 33, 1242-1245.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Andrião-Escarso, S. H., Diniz, H., Hamaguchi, A., ... Homsí-Brandeburgo, M. L. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venom and on activity of phospholipases A₂. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 27, 21-30.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Oliveira, F., Fransheschi, A. M., Rucavado, A., ... Homsí-Brandeburgo, J. R. (2001). Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, 39, 1863-1869.
- Cáceres, A. (2009). *Vademécum nacional de plantas medicinales*. Guatemala: Ed. Universitaria.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (1989). *The venomous reptiles of Latin America*. Ithaca: Cornell University Press.
- Carvalho, B. M. A., Santos, J. D. L., Xavier, B. M., Almeida, J. R., Resende, L. M., Martins, W., ... Marchi-Salvador, D. P. (2013). Snake venom PLA2s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013, 153045. doi: 10.1155/2013/153045
- Castro, O., Gutiérrez, J. M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 597-607.
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303-323.
- da Silva, J. O., Fernandes, R. S., Tícli, F. K., Oliveira, E. K., Mazzi, M. V., Franco, J. J., ... Sampaio, S. V. (2007). Triterpenoid saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*, 50, 283-291.

- de Moura, V. M., Serra, A. N., Veras, R. H., Varjão, J. L., Almeida, J. D., de Sousa R. L., ... Dos-Santos M. C. (2014). A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*, *85*, 59-68.
- Dole, V. P. (1956). A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *Journal of Clinical Investigation*, *35*, 150-154.
- Dothel, G., Vasina, V., Barbara, G., & De Ponti, F. (2013). Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues. *Pharmacology & Therapeutics*, *139*, 71-86.
- Gupta, Y. K., & Peshin, S. S. (2012). Do Herbal Medicines Have Potential for Managing Snake Bite Envenomation? *Toxicology International*, *19*, 89-99.
- Gutiérrez, J. M. (1995). Clinical toxicology of snakebite in Central America. En J. Meier & J. White (Eds). *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons* (pp. 645-665). Boca Raton: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, *50*, 377-394.
- Gutiérrez, J. M. (2010). Snakebite Envenomation in Central America. En S. Mackessy. *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 492-505). Boca Raton: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., & Cerdas, L. (1986). Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *84C*, 159-164.
- Gutiérrez, J. M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J. A., Chaves, F., Alvarado, J., & Rojas, E. (1990). Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. *Toxicon*, *28*, 1127-1129.
- Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, *82*, 841-850.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, *54*, 958-975.
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, *54*, 976-987.
- Gutiérrez, J. M., Warrell, D. A., Williams, D. J., Jensen, S., Brown, N., Calvete, J., & Harrison, R. (2013). The need for gull integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: The way forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(6), e2162. doi: 10.1371/journal.pntd.0002162.
- Gutiérrez, J. M., Tsai, W. C., Pla, D., Solano, G., Lomonte, B., Sanz, L., ... Calvete, J. J. (2013). Preclinical assessment of a polyspecific antivenom against the venoms of *cerrophidion sasai*, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophymegas*: insights from combined antivenomics and neutralization assays. *Toxicon*, *64*, 60-69.
- Hay, J. O. (2002). *Estudio etnofarmacológico de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, del paludismo y de la mordedura de serpientes, en tres departamentos de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Service Coopération au Développement, Institut de recherche pour le développement.
- Harwood, L. M. & Moody, C. J. (1989). *Experimental organic chemistry: Principles and Practice*. Wiley-Blackwell.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., & Simmonds, M. S. J. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2 – A global assessment based on bibliographic sources. *Journal of Ethnopharmacology*, *125*, 108-144.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., & Núñez, V. (2009). Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding

- snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon*, 54, 1012-1028.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W. Ch., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomings of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: Toxicological and taxonomic insights. *Journal of Proteomics*, 75(5), 1675-1689. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.016.
- Martz, W. (1992). Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, 30(10), 1131-1142.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española del Medicamento, & Boletín Oficial del Estado (España). (2002). *Real Farmacopea Española* (2ª ed.). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Morales, C. A. (2012). *Guía de animales ponzoñosos de Guatemala: Manejo del paciente intoxicado* (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Morton, J. F. (1977). Some folk-medicine plants of Central America markets. *International Journal of Crude Drug Research*, 15, 165-192.
- Nuffield Council on Bioethics (2005a). Ethical issues raised by animal research (Chapter 3). En *The ethics of research involving animals* (pp 31-58). London: Autor. Recuperado de <http://nuffield-bioethics.org/wp-content/uploads/The-ethics-of-research-involving-animals-full-report.pdf>
- Nuffield Council on Bioethics (2005b). The use of animals for research in the pharmaceutical industry (Chapter 8.). En *The ethics of research involving animals* (pp 131-152). London: Autor. <http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/The-ethics-of-research-involving-animals-full-report.pdf>
- Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce-Soto, L., Merfort, I., & Lomonte, B. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, 66(9), 1017-1025.
- Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R. G., Fonnegra, R., ... Quintana, J. C. (2004). Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(7), 969-977. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004000700005>
- Orellana, S. L. (1987). *Indian medicine in highland Guatemala*. Albuquerque: University of New Mexico Press.
- Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S. P., ... Vélez, H. N. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 493-504.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., ... Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 233-241.
- Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S. L., Fonnegra, R., Osorio, R. G., García, M. E., & Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 505-511.
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (*Zingiberaceae*) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, 32(3), 365-374.
- Pereañez, J. A., Jiménez, S., Quintana, J. C., Núñez, V., Fernández, M., & Restrepo, Y. (2008). Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de Heliconias. *Vitae*, 15(1), 157-164.
- Rucavado, A., Soto, M., Escalante, T., Loría, G. D., Armi, R., & Gutiérrez, J. M. (2005). Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(1), 123-131.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001). Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. I. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante (Proyecto FODECYT

- No. 47-99). Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Saravia, P., Rojas, E., Escalante, T., Arce, V., Chaves, E., Velásquez, R., ... Gutiérrez, J. M. (2001). The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon*, 39(2-3), 401-405.
- Santhosh, M. S., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R. M., Jnaneshwari, S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2013). Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 13, 106-123.
- Sosa, S., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Pizza, C., Altinier, G., & Tubaro, A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activities of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 8(2)1, 211-215.
- Wang, W., Shih C., & Huang, T. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 224-230.
- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkel, K. D., ... International Society on Toxicology. (2010). The Global Snake Bite Initiative: and antidote for snake bite. *Lancet*, 375(9708), 89-91.
- World Health Organization. (2007). *Rabies and envenomings, a neglected public health issue: report of a consultative meeting, WHO, Geneva, 10 January 2007*. Geneva: Autor. Recuperado de http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf