

Evaluación de la reducción en las lesiones inducidas por una Fosfolipasa del veneno de *Bothrops atrox* mediante el tratamiento con el extracto de *Bixa orellana* y una fracción de *Swietenia macrophylla* en un modelo murino

**Ana María Henao Duque
Médica Veterinaria**

Directores

**Berardo de Jesús Rodríguez, MV, Patólogo, PhD
Vitelbina Núñez Rangel, Bact., MSc, PhD**

Maestría en Ciencias Veterinarias

Línea de Patología Animal

**Universidad de Antioquia
2015**

Agradecimientos

A mi familia y a mi pareja por su apoyo incondicional durante este tiempo. A mis tutores por estar siempre abiertos a la discusión y por su colaboración. A los miembros del comité tutorial por su apoyo y sugerencias a este trabajo. A todos los miembros del Programa de Ofidismo/Escorpionismo-Serpentario y del Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias por su ayuda y por hacer parte del desarrollo de este trabajo.

Dedicatoria

A las serpientes que son mi fuente de inspiración.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	8
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo general.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 MARCO TEÓRICO	15
3.1 Accidente Ofídico y Epidemiología.....	15
3.2 Componentes del veneno y lesiones histopatológicas ocasionadas	16
3.3 Patogenia de las miotoxinas	18
3.4 Lesiones generadas por las miotoxinas	20
3.5 Inhibición de Fosfolipasas A ₂ por compuestos fenólicos presentes en extractos de plantas.....	21
3.6 Estudios con plantas antiofídicas en Antioquia	22
3.6.1 <i>Bixa orellana</i> L. (Achiote):.....	22
3.6.2 <i>Swietenia macrophylla</i> King (Árbol de la caoba):	24
4 CUERPO DEL TRABAJO.....	27
4.1 Cumplimiento del Objetivo 1: Toxicidad aguda oral de la fracción “Sm 13-26” del extracto de hojas de <i>Swietenia macrophylla</i>	27
4.1.1 Materiales y métodos:.....	27
4.1.1.1 Preparación de la fracción	27
4.1.1.2 Animales de experimentación.....	27
4.1.1.3 Dosis y administración del extracto.....	28
4.1.1.4 Análisis estadístico	29
4.1.2 Resultados.....	29
4.1.2.1 Seguimiento clínico de los animales y necropsia	29
4.1.2.2 Hallazgos histopatológicos	31
4.1.3 Discusión.....	33
4.2 Cumplimiento parcial del Objetivo 3: Inhibición de los efectos de la PLA ₂ Lis49 del veneno de <i>Bothrops atrox</i> por la fracción “Sm 13-26” al administrarse vía oral como pre-tratamiento.....	35
4.2.1 Materiales y Métodos.....	35
4.2.1.1 Purificación de la toxina	35
4.2.1.2 Animales de experimentación.....	36
4.2.1.3 Administración de tratamiento oral.....	36
4.2.1.4 Actividad de la Creatina-kinasa (CK)	37
4.2.1.5 Análisis Histopatológico.....	37

4.2.1.6	Análisis estadístico	37
4.2.2	Resultados.....	37
4.2.2.1	Administración oral de la fracción y la toxina	38
4.2.2.2	Actividad de la Creatina-kinasa (CK)	38
4.2.2.3	Hallazgos histopatológicos	38
4.2.3	Discusión.....	41
4.3	Cumplimiento de los Objetivos 2 y 3: Artículo para publicación	44
4.3.1	Resumen.....	44
4.3.2	INTRODUCCIÓN.....	45
4.3.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
4.3.3.1	Purificación de la toxina.....	47
4.3.3.2	Material vegetal y preparación del extracto de <i>Bixa orellana</i>	48
4.3.3.3	Animales de experimentación.....	48
4.3.3.4	Ensayo de inhibición con la administración <i>in situ</i> del extracto	49
4.3.3.5	Ensayo de inhibición con la administración oral del extracto.....	49
4.3.3.6	Análisis histopatológico	50
4.3.3.7	Análisis estadístico	51
4.3.4	RESULTADOS	51
4.3.4.1	Ensayo de inhibición <i>in situ</i>	51
4.3.4.2	Ensayo de inhibición oral	53
4.3.5	DISCUSIÓN.....	57
4.3.6	Agradecimientos.....	62
4.3.7	REFERENCIAS	62
5	CONCLUSIONES GENERALES	70
6	RECOMENDACIONES.....	71
7	BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS		

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Escala de medición de las variables histopatológicas con Hematoxilina-Eosina	29
Tabla 2. Parámetros de las observaciones clínicas y comportamentales de los animales durante el experimento (2000 y 300mg/kg).....	30
Tabla 3. Hallazgos histopatológicos de los animales del grupo tratamiento 2000mg/kg (n=5).....	32
Tabla 4. Escala de medición de las variables histopatológicas	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seguimiento del peso corporal en los animales tratados y no tratados con la dosis de 2000mg/kg.....	31
Figura 2. Seguimiento del peso corporal en los animales tratados y no tratados con la dosis de 300mg/kg.....	31
Figura 3. Detalle del hígado (A y B) y riñón (D y E) entre las dosis evaluadas. A y D: 300mg/kg, B y E: 2000mg/kg, C y F: Controles. En la figura B, las flechas señalan la cariomegalia y binucleación observada a esa dosis. En la figura E, las flechas señalan el área de necrosis tubular y de nefrosis. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E, 400x). ...	33
Figura 4. Niveles de la enzima Creatina-kinasa a las tres horas post-aplicación de la miotoxina	39
Figura 5. Fragmentos de músculo gastrocnemio, figuras A, C y E 24 horas, B, D y F a las 48 horas. Note la necrosis y la fagocitosis por neutrófilos a las 24 horas (●), mientras que a las 48 horas predominan los macrófagos que fagocitan los restos de fibras necróticas y la proliferación de células satélite miogénicas y de fibroblastos (cabeza de flechas). A y B: Tratamiento con la fracción "Sm13-26"; C y D: Toxina; E y F: Controles. Tinción H-E, 400X.....	40
Figura 6. Fragmentos de músculo gastrocnemio a las 24 horas. El * señala las áreas de necrosis de las fibras, note que no hay diferencias entre las figuras A y C. A: Tratamiento con Fx"Sm13-26", B: Control, C: Toxina. Tinción HAF, 400X.....	41
Figura 7. Niveles de la enzima Creatina-kinasa a las tres horas post-aplicación del tratamiento en el ensayo de inhibición <i>in situ</i> . Tx-SSF: Control positivo; Tx-Bx: Tratamiento con el extracto; SSF-Bx y SSF-SSF: Controles negativos. Las mediciones se hicieron en dos repeticiones.....	51

Figura 8. Fragmentos de músculo gastrocnemio a las 3 horas post-aplicación del tratamiento: A. Toxina-Solución salina, B. Toxina-Extracto de hojas, C. Extracto de hojas-Solución salina. El * muestra la contracción y necrosis de la fibra muscular y el ● indica la degeneración hialina de las fibras. Tinción H-E, 400X.	53
Figura 9. Fragmentos de músculo gastrocnemio a las 3 horas post-aplicación del tratamiento: A. Toxina-Solución salina, B. Toxina-Extracto de hojas, C. Extracto de hojas-Solución salina. El * resalta el área donde hay pérdida de estriaciones de las fibras y el ● indica las áreas de lisis y necrosis de las fibras. Tinción HAF, 400X.....	53
Figura 10. Niveles de la enzima Creatina-kinasa a las tres horas post-aplicación del tratamiento en el ensayo de inhibición oral. Bx-TX: Tratamiento; Bx-SSF: Control negativo; SSF-TX: Control positivo. Las mediciones se hicieron en dos repeticiones.....	55
Figura 11. Fragmentos de músculo gastrocnemio, Figuras A, C y E 24 horas, B, D y F a las 48 horas. Nótese la necrosis y la fagocitosis por neutrófilos a las 24 horas (●), mientras que a las 48 horas predominan los macrófagos que fagocitan los restos de fibras necróticas y la proliferación de células satélite miogénicas y de fibroblastos (flechas). A y B: Tratamiento con el extracto; C y D: Toxina; E y F: Controles. Tinción H-E, 400X.	56
Figura 12. Fragmentos de músculo gastrocnemio a las 24 horas. El * señala las áreas de necrosis de las fibras, nótese que no hubo diferencias entre las figuras A y C. A: Tratamiento con el extracto, B: Control, C: Toxina. Tinción HAF, 400X.	57

Lista de Abreviaturas

B. orellana: *Bixa orellana*

B. asper: *Bothrops asper*

B. atrox: *Bothrops atrox*

CK: Enzima Creatina-kinasa

OECD: Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLA₂ Lis49: Fosfolipasa A₂ Lisina 49

PLA₂ Asp49: Fosfolipasa A₂ Aspartato 49

SSF: Solución salina fisiológica

Sm13-26: Fracción 13-26 del extracto de hojas de *Swietenia macrophylla*

S. macrophylla: *Swietenia macrophylla*

T.i.d.: Tres veces al día

Evaluación de la reducción en las lesiones inducidas por una Fosfolipasa del veneno de *Bothrops atrox* mediante el tratamiento con el extracto de *Bixa orellana* y una fracción de *Swietenia macrophylla* en un modelo murino

RESUMEN GENERAL

En Colombia, el 97% de los accidentes ofídicos son ocasionados por serpientes de la familia Viperidae, siendo el más común el Bothrópico, donde las víboras conocidas como mapaná, X o taya (*Bothrops asper* y *Bothrops atrox*) son las causantes de hasta el 70% del total de accidentes. Sus venenos producen efectos locales de rápida instalación y efectos sistémicos severos que generan secuelas como amputaciones, pérdida de masa muscular o dificultades motoras entre el 6 a 10% de los pacientes afectados. Si bien, el antiveneno es el único tratamiento efectivo para estos accidentes, se sabe de su capacidad limitada para neutralizar los efectos locales del veneno que son ocasionados por toxinas de rápida acción; entre ellas las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) que producen mionecrosis local. Por esta razón, diversos autores han planteado estudios con terapias adyuvantes que neutralicen o inhiban estos componentes y de esta forma se reduzcan los efectos locales y sus secuelas.

Debido a que las plantas ofrecen gran cantidad de compuestos con potencial farmacológico, se han realizado estudios experimentales en varias partes del mundo que evalúan la actividad anti-ofídica de estas, tanto en las que se utilizan en la medicina tradicional como terapia en dichos envenenamientos, o en las que tienen actividades biológicas que se han relacionado con su potencial antiofídico. A partir de dichos estudios, se encontró que el extracto de hojas de *Bixa orellana* (Achiote) y la fracción Sm13-26 del extracto de hojas de *Swietenia macrophylla* (Árbol de la caoba) redujeron los efectos tóxicos *in vitro* e *in vivo* del veneno completo de *B. asper/atrox* y la fracción Sm13-26 también redujo el efecto de las PLA_{2s} miotóxicas, no obstante la toxicidad de esta fracción no se ha dilucidado completamente. En esta investigación se evaluó la toxicidad aguda oral de la fracción Sm13-26. Adicionalmente, se evaluó el extracto de hojas de *Bixa orellana*

como inhibidor de la mionecrosis ocasionada por la PLA₂ Lis49 del veneno de *B. atrox*, para ello se utilizó como tratamiento *in situ* después de la aplicación de la toxina. La fracción 13-26 y el extracto de *Bixa orellana* también se administraron como tratamiento oral previo a la aplicación de esta toxina, empleando para ello el análisis histopatológico y la evaluación de la actividad de la enzima Creatina-kinasa. Los resultados del estudio revelaron que la fracción Sm13-26 del extracto de *Swietenia macrophylla* presentó signos sugerentes de toxicidad hepática y renal a dosis de 2000mg/kg pero no a 300mg/kg. Respecto a los tratamientos utilizados contra la miotoxina se encontró que el extracto de hojas de *Bixa orellana* aplicado *in situ* después de la administración de la toxina, redujo la mionecrosis local generada por la PLA₂ entre un 38 a 60% y fue estadísticamente significativo, hecho que se evidenció en la medición de Creatina-kinasa ($p=0,011$) y en la evaluación histopatológica, donde el porcentaje de mionecrosis se redujo entre el 42,56-46,40% al 16,19-28,00%. Los extractos administrados como pre-tratamiento oral no disminuyeron las lesiones ocasionadas por esta miotoxina.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El accidente ofídico es un problema de salud pública que afecta las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó dicho evento como una de las enfermedades tropicales desatendidas (WHO, 2009). En Colombia, hasta la semana 53 del año 2014 se reportaron 4303 casos de accidente ofídico (Sivigila, 2014), sin embargo debido al alto índice de subregistro se estima que esta cifra sea mucho mayor.

En Colombia hasta el 97% de los accidentes son ocasionados por víboras, entre estas las conocidas como mapaná, X, taya o cuatro narices (*Bothrops asper* y *Bothrops atrox*) ocasionan hasta el 70% de dichos accidentes (Otero et al., 2002). Sus venenos generan importantes efectos locales y sistémicos como inflamación, mionecrosis, hemorragia, alteraciones de la coagulación y nefrotoxicidad. Se estima una letalidad del 3 al 5% y secuelas en el 6 al 10% de los casos, principalmente como consecuencia de la dermonecrosis y la mionecrosis (Otero, 2009).

La mionecrosis es uno de los efectos más sobresalientes en el envenenamiento por víboras como *B. asper*, ya que produce pérdida importante del tejido muscular, lo que dificulta la reparación y genera secuelas permanentes en el paciente (Gutiérrez, 2002). Entre los componentes más abundantes del veneno de *B. asper* y *B. atrox* (24,1-45%) se encuentran las fosfolipasas A₂ (PLA₂), las cuales poseen actividad miotóxica, entre otros efectos (Angulo y Lomonte, 2009; Núñez et al., 2009). Estas toxinas son responsables de algunos de los efectos locales del veneno, entre ellos la mionecrosis y el edema local (Gutiérrez, 2002). Una de estas fosfolipasas, denominada PLA₂ Lisina49 es un componente del veneno de baja letalidad que genera una destrucción rápida del músculo, y aunque su mecanismo de acción no se conoce exactamente, se sabe que a nivel local es la

responsable del desarrollo de mionecrosis, infiltración leucocitaria moderada, hiperalgesia y edema (Núñez et al., 2004a; Lomonte et al., 2012).

Otro efecto importante del veneno, relacionado con la mionecrosis, es que promueve infecciones bacterianas secundarias que conllevan a celulitis, abscesos o fascitis necrotizantes, además la regeneración del músculo después de los efectos tóxicos del veneno se ve disminuida, lo que conlleva al desarrollo de secuelas permanentes (Otero, 2009; Gutiérrez et al., 2009). Por esto es necesario conocer con detalle las lesiones generadas por toxinas específicas y entender los mecanismos fisiopatológicos de estas, con el fin de encontrar alternativas terapéuticas que neutralicen o inhiban dichos efectos, así como dilucidar compuestos con posible aplicación farmacéutica a partir de las toxinas (Gutiérrez, 2002).

El antiveneno es el único tratamiento eficaz que neutraliza la acción del veneno, sin embargo la neutralización de los efectos que se producen a nivel local es limitada, debido a que estos se desarrollan en minutos. Por otro lado, existen múltiples factores extrínsecos que contribuyen a la ineficacia del tratamiento para contrarrestar las lesiones locales, como es el retraso en la administración de la terapia que ocurre en áreas rurales y de difícil acceso, en ocasiones a la no disponibilidad de este medicamento en hospitales rurales y a la práctica de la medicina tradicional como terapia primaria para tratar estos accidentes, hecho que se estima ocurre entre el 40-50% de los pacientes mordidos (Gutiérrez et al., 1998; Otero, 2009).

Por esta razón es fundamental encontrar tratamientos adyuvantes al antiveneno que permitan neutralizar los efectos locales de rápida instalación; como la mionecrosis, permitiendo disminuir las secuelas que se generan a nivel local (Gutiérrez et al., 1998; Otero et al., 2000a). Es así como las plantas que se han utilizado desde la antigüedad por la medicina tradicional para el tratamiento de las mordeduras de serpientes, se han convertido en una fuente de compuestos bioactivos con potencial farmacológico, por lo cual se han realizado diversos

estudios en la búsqueda de alternativas antiofídicas a partir de sus extractos (Flórez, 1951; Joly et al., 1987; Martz, 1992; Houghton y Osibogun, 1993; Otero et al., 2000a-2000b y 2000c; Núñez et al., 2004b y 2004c; Ode y Asuzu, 2006; Fung et al., 2009). En estos estudios se han encontrado algunas plantas con resultados prometedores *in vitro* e *in vivo*, sin embargo se deben realizar investigaciones más profundas, entre ellas la evaluación de su toxicidad, para determinar y garantizar la inocuidad de estos compuestos, que podrían considerarse en el futuro coadyuvantes en la terapia antiofídica (Otero et al., 2000a; Pereañez et al., 2010; Patiño et al., 2012).

A partir de dichos estudios se demostró la inhibición de varios de los efectos del veneno de *B. asper*/*B. atrox* por varias plantas empleadas en la medicina tradicional; entre ellas *Bixa orellana* (Achiote) (Otero et al., 2000b, 2000c), cuyo extracto inhibió en un 100% el efecto hemolítico *in vitro* de este veneno, indicando inhibición de PLA₂ (Otero et al., 2000c). En otro estudio, una planta con resultados prometedores fue *Swietenia macrophylla* (Árbol de la caoba), la cual demostró propiedades inhibitorias de PLA_{2s} del veneno de serpientes, tanto activas como inactivas enzimáticamente (Miotoxina II *B. asper* y Miotoxina I *B. atrox*) (Pereañez et al., 2010). Adicionalmente, en un estudio posterior donde se evaluaron diferentes fracciones del extracto de hojas de esta planta; una de ellas denominada "Sm13-26", demostró una actividad inhibitoria *in vitro* superior al 80% contra los efectos miotóxicos y edematizantes inducidos por PLA₂ Lis49 del veneno de *B. atrox* (Pereañez et al., 2013).

Por lo anterior, es fundamental el desarrollo de estudios *in vivo* con los extractos o compuestos que han demostrado efectos inhibitorios de las toxinas de los venenos *in vitro*; como es el caso del extracto de *Bixa orellana* y la fracción "Sm13-26" de *Swietenia macrophylla*, con el fin de encontrar una alternativa o un adyuvante a los antivenenos que puedan ser usados en un futuro en la terapia de estos accidentes. El objetivo de este tipo de estudios a largo plazo es disponer de un tratamiento de aplicación en el sitio de ocurrencia de la mordedura, que permita

retardar o inhibir los efectos locales del veneno y de esta forma disminuir los efectos secundarios y/o secuelas de las mordeduras por víboras. Adicionalmente es importante caracterizar a fondo productos con posible aplicación terapéutica, con el fin de profundizar en sus mecanismos de acción, así como en el conocimiento sobre la toxicidad de los mismos, lo cual es requerido previo a la realización de estudios clínicos a futuro.

En este trabajo se evaluaron el extracto de hojas de *B. orellana* y la fracción “Sm13-26” del extracto de *S. macrophylla* como inhibidores de la mionecrosis local inducida por la PLA₂ Lis49 del veneno de *B. atrox*, al administrarse vía oral como pre-tratamiento y local (*B. orellana*). Adicionalmente se determinó la toxicidad aguda oral de la fracción “Sm13-26”.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el extracto de *Bixa orellana* y una fracción activa de *Swietenia macrophylla* reducen los efectos tóxicos de una fosfolipasa A₂ homóloga del veneno de *Bothrops atrox*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar si la fracción “Sm13-26” del extracto de *Swietenia macrophylla* presenta toxicidad aguda oral en un modelo murino.

Determinar si el extracto de *Bixa orellana* posee efecto inhibitorio de la mionecrosis local inducida por la fosfolipasa A₂ homóloga del veneno de *Bothrops atrox* tras la aplicación local de este extracto.

Determinar si los extractos de *Bixa orellana* y la fracción “Sm13-26” de *Swietenia macrophylla* poseen efectos quimiopreventivos en las lesiones inducidas por una miotoxina del veneno de *Bothrops atrox*.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 ACCIDENTE OFÍDICO Y EPIDEMIOLOGÍA

En los países tropicales el accidente ofídico es un problema de salud pública, en el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó dicho evento como una de las enfermedades tropicales desatendidas (WHO, 2009). Se estima que al menos 421.000 envenenamientos y 20.000 muertes se producen en todo el mundo cada año, pero se presume que estas cifras pueden ser de hasta 1.841 millones de envenenamientos y 94.000 muertes debido al alto índice de subregistro que se presenta (WHO, 2012). Este accidente en Colombia afecta anualmente entre 3500 y 4000 personas, sin embargo debido al subregistro se cree que esta cifra es mucho mayor; en el año 2014 se reportaron 4303 casos de accidentes ofídicos, siendo Antioquia el departamento que reporta el mayor número de accidentes (Sivigila, 2014). La letalidad anual se registra entre el 3 y 5% y las secuelas entre el 6 y 10% de los casos, principalmente como resultado de la dermonecrosis y la mionecrosis (Otero, 2009).

Se estima que el 40-50% de las personas que sufren estos accidentes acuden a la medicina tradicional como tratamiento inicial, lo que genera retraso en la administración del antiveneno; cuando dicho tratamiento se administra dos horas después de la mordedura hay mayor riesgo de secuelas, fallo renal agudo, hemorragia en sistema nervioso central, síndrome compartimental, necrosis local u otras secuelas (Otero, 2009).

En Colombia hasta el 97% de los accidentes son ocasionados por vipéridos de los géneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Bothriechis*, *Lachesis*, *Crotalus*, *Bothriopsis* y *Bothrocophias*. Las serpientes del género *Bothrops* son las responsables de la mayoría de muertes humanas causadas por mordeduras de serpientes en el nuevo mundo (Campbell y Lamar, 2004). De éste género, *Bothrops asper* y *Bothrops atrox*, conocidas como mapaná, taya, X, cuatro narices o barba amarilla, etc., ocasionan hasta el 70% de los accidentes (Otero et al., 1992-2002). En

Colombia, *B. asper* está distribuida en las tierras bajas de los andes, sus costas e islas Gorgona y Gorgonilla, entre 0 y 1300msnm, mientras que *B. atrox* se distribuye al este de los Andes y al sur del río Orinoco entre 0-1500msnm (Campbell y Lamar, 2004, Núñez et al., 2009). Sus venenos generan efectos locales como edema, hemorragia local, ampollas, dermonecrosis y mionecrosis, entre las 6 a 8 horas post-mordedura; y efectos sistémicos como desfibrinogénación, trombocitopenia, hipotensión y hemorragia. Adicionalmente, ocasionan infecciones en tejidos blandos como impétigo, celulitis, abscesos y fascitis, que ocurren entre el 11 al 30% de los casos, y se presentan con mayor frecuencia en envenenamientos moderados y graves con lesiones asociadas como mionecrosis, edema y hemorragia local extensa (Otero, 2009).

3.2 COMPONENTES DEL VENENO Y LESIONES HISTOPATOLÓGICAS OCASIONADAS

El veneno de las serpientes es una mezcla compleja de péptidos con actividad enzimática y no enzimática, el veneno de *Bothrops atrox* contiene metaloproteasas (48,5%), fosfolipasa A₂ Lis49 (18,5%), fosfolipasa A₂ Asp49 (5,6%), serinoproteasas (10,9%), L-aminoácido oxidasa (4,7%), desintegrina (1,7%), lecitina tipo C (7,1%), péptido potenciador de bradicinina (0,3%), proteína secretora rica en cisteína (2,6%), fragmento DC (<0,1%) (Núñez et al., 2009).

Las lesiones histopatológicas producidas por envenenamientos abarcan diversos órganos y el grado de lesión es variable; en un estudio post-mortem de perros y gatos mordidos por *Nothechis spp.* (Tiger Snake, Elapidae) se encontraron múltiples trombos en epicardio, pulmón y en capilares glomerulares; aumento del espacio urinario (espacio de bowman) y depósitos de material fibrilar, además de cambios hidrónicos en riñón (Jacoby-Alner et al., 2011). Por otro lado, en un estudio experimental con el veneno completo de *Montvipera xanthina* (Viperidae) donde evaluaron hígado, piel y el músculo gastrocnemio en ratas, observaron la dermis superficial con edema y degeneración del colágeno, además de infiltrado mixto escaso en el tejido y alrededor de los vasos sanguíneos; en la hipodermis hemorragias y necrosis de la grasa; en el hígado congestión y degeneración

hepatocelular y en el músculo gastrocnemio hemorragia, mionecrosis e infiltrado mixto en el perimisio y endomisio (Topyldiz et al., 2012).

Por evidencia encontrada en las necropsias de pacientes humanos y animales domésticos fallecidos por mordeduras de vipéridos y algunos elápidos, así como por estudios experimentales en ratones, se sabe que en los envenenamientos hay un compromiso renal importante, si bien no se ha esclarecido la presencia de una “nefrotoxina” en los venenos, es claro que hay un origen multifactorial en respuesta a otras lesiones y alteraciones sistémicas ocasionadas por los venenos, como mionecrosis, rabdomiólisis, mioglobinuria, hemoglobinuria, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, tromboembolismo y deposición de microtrombos (Pal et al., 2010; Jacoby-Alner et al., 2011; De Roodt et al., 2012). En un estudio experimental realizado con veneno completo de varias especies de *Micrurus* (Elapidae), encontraron lesiones a nivel renal a las 48 horas post-inyección, las cuales fueron descritas como trombos en capilares glomerulares, necrosis tubular renal, exfoliación de células epiteliales, ruptura de la lámina basal, y fueron asociadas a uremia y a depósitos de mioglobina revelados por la coloración Azul de Prusia (De Roodt et al., 2012). En el estudio realizado por Pal et al. (2010), donde evaluaron riñones de personas fallecidas por accidentes por víboras encontraron necrosis tubular aguda en el 100% de los casos, mientras que la necrosis cortical solo se observó en un 25% de los casos. En todos los riñones se evidenciaron lesiones como dilatación tubular y epitelio aplanado, degeneración turbia del epitelio tubular con descamación de células necróticas, cilindros hialinos, edema intersticial, hemorragia e infiltración celular.

En el caso particular de los experimentos con toxinas, se encontró que una “citotoxina” del veneno de *Daboia russelli russelli* (Viperidae) ocasionó necrosis en las células epiteliales tubulares *in vitro* e *in vivo*, así como focos aislados de degeneración de las células tubulares proximales en la corteza renal (Mandal et al., 2007). Respecto a las miotoxinas de *B. asper* y *B. atrox*, no se ha asociado toxicidad sistémica a pesar de que generan mionecrosis local severa (Gutiérrez y Ownby, 2003), no obstante la aplicación experimental de estas toxinas vía

intravenosa en ratones indujo aumento de la Creatina-kinasa (CK) (Gutiérrez et al., 2009).

3.3 PATOGENIA DE LAS MIOTOXINAS

Las fosfolipasas A_2 son uno de los principales componentes del veneno de *Bothrops atrox*. De ellas deriva el grupo más amplio de las denominadas miotoxinas, principales responsables del daño local extenso generado en los accidentes por vipéridos (Gutiérrez et al., 1998; Lomonte et al., 2012). Las PLA_2 se encuentran en todos los organismos, existen varias clases; entre ellas las secretadas, de las cuales algunas están presentes en los venenos de serpientes. Existen tres tipos de fosfolipasas en los venenos y se clasifican según su estructura primaria y el patrón de sus puentes di-sulfuro como tipo I (Neurotoxinas presentes en Elápidos), tipo II (Miotoxinas presentes en Vipéridos) (Núñez et al., 2004c) y tipo III que son muy diferentes estructuralmente y se encuentran en los escorpiones y demás artrópodos (Lomonte et al., 2012). Las miotoxinas tipo II del veneno de vipéridos se clasifican en dos subgrupos; Asp49 y Lis49, esta última no tiene efecto fosfolipolítico, pero eso no interfiere con su actividad miotóxica y otros efectos de daño a la membrana (Núñez et al., 2004a; Lomonte et al., 2003-2012).

Hasta mediados de los años ochenta, se creía que la patogenia de estas miotoxinas tipo II se debía a que catalizaban la hidrólisis de los enlaces éster sn-2 de los fosfoglicéridos, efecto dependiente de Ca^{2+} (Lomonte et al., 2003; Núñez et al., 2004a). Sin embargo en 1984 se aisló en *Agkistrodon piscivorus* (Cottonmouth viper) la primera PLA_2 catalíticamente inactiva; una variante en el residuo 49 donde el aspartato fue reemplazado por lisina, lo que impide que esta toxina pueda ligar calcio y pierda su actividad catalítica (Lomonte et al., 2003-2012; Núñez et al., 2004a). Esta PLA_2 Lis49 también se conoce como fosfolipasa A_2 homóloga y se ha aislado en diferentes vipéridos, entre ellos *B. asper* en la cual se denomina miotoxina II (Chaves et al., 1998; Lomonte et al., 2003) y en *B. atrox* miotoxina I (Kanashiro et al., 2002; Núñez et al., 2004a). La PLA_2 Lis49 es una proteína básica con 120-122 residuos de aminoácidos establecidos por 7 puentes di-sulfuro, es un homodímero en solución con subunidades unidas por enlaces no

covalentes. Su mecanismo de acción no se ha determinado claramente, se cree que actúan en el sarcolema, alterando la permeabilidad de la membrana e induciendo necrosis (Lomonte et al., 2012). Actualmente el mecanismo más aceptado es que los residuos catiónicos e hidrofóbicos en la región C-terminal son los responsables del daño en la membrana, ya que forman interacciones electrostáticas con la cabeza polar de los fosfolípidos de la membrana celular, facilitando la introducción de la proteína en la bicapa lipídica a través de la acción de sus residuos hidrofóbicos (Gutiérrez y Ownby, 2003; Lomonte et al., 2012). Finalmente la alteración de la permeabilidad del sarcolema, genera una rápida despolarización y un aumento del flujo citosólico de calcio, generando hipercontracción de miofilamentos, tumefacción mitocondrial, picnosis nuclear y activación de proteasas dependientes de calcio (Gutiérrez y Ownby, 2003; Villalobos et al., 2007).

Las PLA₂ Lis49 o fosfolipasas A₂ homólogas se caracterizan por tener baja toxicidad sistémica, ocasionando solo mionecrosis local, a diferencia de otras miotoxinas como la crotoxina (Núñez et al., 2004a; Lomonte et al., 2012). Se han descrito varias actividades biológicas de esta toxina, como: disrupción lisosomal de membrana, antimicrobiana, inducción de apoptosis, efectos antitumorales, bloqueo neuromuscular, unión a lipopolisacáridos bacterianos, inhibición de la actividad de la heparina y factor Xa (Gutiérrez et al., 2009; Gallacci y Cavalcante, 2010, Lomonte et al., 2003-2012). Adicionalmente, se ha demostrado que esta toxina induce activación de macrófagos, degranulación de mastocitos, hiperalgesia, edema, activación y liberación de eicosanoides y citoquinas proinflamatorias como IL6 e IL1 β , expresión de COX-2 en el sitio de inyección (Kanashiro et al., 2002; Gutiérrez et al., 2009; Teixeira et al., 2009; Moreira et al., 2013).

En un estudio reciente se encontró que la PLA₂ Lis49 afecta los vasos linfáticos, lo que contribuye con el desarrollo del edema que se genera después de su inyección. *In vitro* se observó que afecta las células del músculo liso en cultivo, e *in vivo* genera contracción de los vasos linfáticos colectores y reducción en su luz,

lo que sugiere que esta miotoxina afecta las células de músculo liso presentes en estos vasos (Mora et al., 2008).

3.4 LESIONES GENERADAS POR LAS MIOTOXINAS

A nivel clínico la Fosfolipasa A₂ homóloga o PLA₂ Lisina 49 es la principal responsable de la mionecrosis local, se cree que la afinidad de esta toxina por el músculo está dada por la existencia de un receptor de “alta afinidad” en estas células, sin embargo no se conoce exactamente la naturaleza de dicho “receptor de afinidad” (Gutiérrez et al., 2009). Los hallazgos histopatológicos ocasionados por esta fosfolipasa A₂ son mionecrosis local extensa, edema moderado, infiltrado por neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Kanashiro et al., 2002; Lomonte et al., 2003). Por inmunohistoquímica se ha determinado pérdida de las estriaciones y pérdida de la inmunotinción para desmina y α -actinina (Gutiérrez et al., 2009). En observaciones experimentales las fosfolipasas no afectan las células satélites miogénicas, vasos sanguíneos o nervios, lo que implica que esta toxina no interfiere con el proceso reparativo y regenerativo que se da mediante la activación de estas células satélites y la membrana basal de las células necróticas (Gutiérrez y Ownby, 2003).

Si bien esta toxina produce miotoxicidad severa en el sitio de inyección, no genera signos de miotoxicidad sistémica, por lo que se ha sugerido la existencia de un receptor específico en la célula muscular (Gutiérrez y Ownby, 2003). Al administrar la toxina vía endovenosa se incrementa levemente la creatina-kinasa (CK) y en análisis toxico-cinéticos se ha confirmado alta concentración de la toxina a nivel local en el músculo inyectado pero no a nivel sistémico (Gutiérrez et al., 2009). En trabajos preliminares donde se evaluó la actividad farmacológica de una PLA₂ (Aspartato 49) del veneno de *B. asper*, se observó incremento importante de isoenzimas de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, sin embargo no se pudo correlacionar este efecto con lesiones histopatológicas en riñón, corazón y pulmón a las 3 y 24 horas después de la administración de la toxina. El único cambio observado a nivel sistémico fue una moderada hiperemia pulmonar a las 24 horas,

mientras que el único órgano afectado fue el músculo en el que se inyectó la toxina (Gutiérrez et al., 1986).

A nivel sistémico, la PLA₂ Lis49 genera aumento de enzimas citosólicas como Creatina-kinasa (CK), Lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), mioglobina y creatina (Kanashiro et al., 2002; Lomonte et al., 2003; Gutiérrez et al., 2003-2009; Núñez et al., 2004a). La PLA₂ Lis49, también produce edema moderado y un infiltrado leucocitario importante, donde predominan los polimorfonucleares neutrófilos a las 6-24 horas después de su aplicación, mientras que a las 24-48 horas predominan los mononucleares (Teixeira et al., 2009).

3.5 INHIBICIÓN DE FOSFOLIPASAS A₂ POR COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EXTRACTOS DE PLANTAS

Los extractos de plantas han sido usados durante muchos años por la medicina tradicional como tratamiento para diferentes dolencias, entre ellas las mordeduras por serpientes venenosas. La actividad antiofídica de los extractos de plantas, se ha atribuido a compuestos como flavonoides, cumarinas y otros compuestos polifenólicos, ya que presentan actividad antioxidante que previene, detiene o disminuye el daño oxidativo ocasionado por los venenos (Pereañez et al, 2011). Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas y microorganismos que tienen más de una unidad de fenol por molécula, se dividen en taninos hidrolizables (ésteres de ácido gálico, de glucosa y otros azúcares), fenilpropanoides (ligninas, flavonoides, taninos condensados), entre otros. En estudios experimentales dichos compuestos han mostrado actividades antioxidantes, bactericidas, antihelmínticas y anti-hepatotóxicas, entre otras. (Pereañez et al., 2010). En un estudio *in vitro* donde se evaluó la inhibición de la Crotoxina (PLA₂ Asp49) por varios compuestos fenólicos, se encontró que el propilgalato y el epigallocatequingalato presentaron un gran porcentaje de inhibición de esta toxina (Pereañez et al, 2010). En estudios experimentales los compuestos fenólicos han inhibido las fosfolipasas A₂ del veneno de serpientes (Lindahl and Tagesson, 1997); entre ellos, el ácido rosmarínico y el α-Tocoferol,

cuyo mecanismo de inhibición propuesto es por la formación puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del anillo aromático del compuesto con los aminoácidos de la toxina, lo que genera interferencia en la capacidad de ligar calcio por parte de esta. Otro mecanismo propuesto es la interacción con puentes hidrofóbicos mediados por anillos aromáticos entre el compuesto y la toxina (Chandra et al., 2002, Ticli et al., 2005, Da Silva et al., 2009, Pereañez et al., 2011).

3.6 ESTUDIOS CON PLANTAS ANTIOFÍDICAS EN ANTIOQUIA

En un estudio realizado en la región del Urabá Chocoano y Antioqueño, donde se entrevistaron a curanderos y chamanes de la región se determinó que utilizaban 74 especies de plantas para “curar” los accidentes ofídicos, aplicándolas como baños, bebidas, emplastos o “chupaderas” (Otero et al., 2000a). Dichas plantas fueron colectadas, identificadas y clasificadas taxonómicamente y sus extractos etanólicos fueron estudiados *in vitro*. De estas, solo 12 mostraron inhibición de algunas de las actividades del veneno de *B. asper/atrox*, entre ellas *Bixa orellana* (Achiote) (Otero et al., 2000b-2000c; Núñez et al., 2004b-2004c).

Por otro lado, en el estudio realizado por Pereañez et al., (2011) donde evaluaron la inhibición de PLA₂s del veneno de *B. asper* usando plantas vasculares con actividades antioxidantes, *Swietenia macrophylla* (Árbol de la caoba) presentó un porcentaje de inhibición superior al 60% en la citotoxicidad *in vitro* de las toxinas, además de que el extracto no demostró citotoxicidad *in vitro*.

3.6.1 *Bixa orellana* L. (Achiote):

Este arbusto nativo de Centro y Suramérica que alcanza 3-5 metros de altura pertenece a la familia Bixaceae (Viuda-Martos et al., 2012; Ciro et al., 2012), es empleado para diversas aplicaciones que van desde un uso culinario como colorante, hasta cosmético y terapéutico. En la medicina tradicional le atribuyen actividades como antídoto contra la intoxicación con yuca brava y mordeduras de serpientes, también como antidiarreico, antiemético, antiséptico, expectorante, antiinflamatorio dérmico, cicatrizante y como tratamiento para la diabetes, las quemaduras, la gonorrea, el asma, entre otros (Silva et al., 1998; Otero et al.,

2000a; Viuda-Martos et al., 2012). El extracto etanólico de hojas y ramas de *B. orellana* demostró inhibición de algunas actividades del veneno de *B. atrox*/*B. asper in vitro* (Otero et al., 2000b-2000c; Núñez et al., 2004b-2004c).

El efecto letal del veneno de *B. asper/atrox* fue inhibido de manera parcial (45-80%) pero significativa en ensayos *in vitro* (pre-incubando el extracto con el veneno previo a su aplicación en ratones). Así mismo, prolongó el tiempo de supervivencia cuando se les administró dicho extracto cinco minutos antes de la administración del veneno, no obstante se redujo en gran medida la inhibición y la protección cuando se administró el extracto y el veneno en forma independiente. En el mismo estudio se encontró que este extracto inhibió en un 100% el efecto hemolítico *in vitro* del veneno indicando actividad anti-fosfolipasas A₂ presentes en dicho veneno (Otero et al., 2000b-2000c). Adicionalmente, neutralizó el edema en un 77 % *in vitro* y 28% *in vivo* y el efecto hemorrágico *in vitro* en un 100% y 19% *in vivo*. Esta reducción del efecto antihemorrágico *in vivo* se asocia a que el tiempo requerido para el desarrollo de la hemorragia local es de 4-6 minutos (Núñez et al., 2004b).

Estudios fitoquímicos de las hojas de *B. orellana* demuestran la presencia de flavonoides bisulfatos, terpenoides, tocotrienoles y un aceite esencial compuesto principalmente por sesquiterpenos (Shilpi et al., 2006; Viuda-Martos et al., 2012; Stohs, 2013). Respecto a la toxicidad de esta planta, *B. orellana* está catalogada como aprobada y segura para el consumo humano (GRAS, de las siglas en inglés: Generally Recognized as Safe). En el estudio realizado por Silva et. al., 1998, se determinó que la DL₅₀ del extracto liofilizado de hojas de Achiote en ratones albinos hembras *Mus musculus* cepa Balb/c, fue de 0,3933326 g/kg y 14,5816 g/kg a las 72 horas, por vía intraperitoneal y por vía oral respectivamente. Del mismo modo, al evaluar la toxicidad a dosis repetidas del extracto liofilizado de hojas de *B. orellana* a dosis de 20 g/kg vía oral durante 30 días, no se observaron cambios en la conducta, apetito, sed y sueño de los animales y los estudios anatomopatológicos no revelaron anomalías histopatológicas (Silva et al.,

1998). En un estudio realizado por Shilpi et al., 2006 no se observaron efectos letales del extracto de *B. orellana* a dosis de 4000 mg/kg en ratones después de 24 horas post-aplicación. Adicionalmente, se ha encontrado baja proporción de alcaloides, saponinas y glucósidos cardíacos en el extracto de hojas; los cuales son compuestos de alta toxicidad con relación a la alta proporción de flavonoides, terpenos y fenoles que son de bajo potencial tóxico (Stohs, 2013). En estudios realizados en humanos, al administrar el extracto liofilizado de hojas (250mg t.i.d.) vía oral durante 6 meses solo se observó constipación en el 3% de los pacientes tratados. En ratas, al administrar el extracto crudo a dosis de hasta 120mg/kg durante 7 días solo se reportó un incremento leve en el recuento de glóbulos rojos, en el nivel sérico de potasio, de sodio y de cloro, de Alanino-Amino-Transferasa (ALT) y de Aspartato-Amino-Transferasa (AST) (Stohs, 2013). En Colombia, el uso medicinal externo del extracto de hojas de *B. orellana* está aprobado por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) (Fonnegra y Jiménez, 2007).

3.6.2 *Swietenia macrophylla* King (Árbol de la caoba):

Este árbol de distribución tropical se encuentra en Centro y Suramérica, en el Oeste de la India, en Malasia y en el centro y sur de China, pertenece a la familia Meliaceae y puede alcanzar entre 40 y 60 metros de altura (Brown et al., 2003; Moghadamtousi et al., 2013). Esta planta se utiliza en Asia para el tratamiento de diversas dolencias en función de sus efectos antimicrobianos, anti-inflamatorios, antioxidantes, anti-mutagénicos, anticancerígenos, antitumorales y actividades antidiabéticas (Moghadamtousi et al., 2013). Las semillas tienen varios usos; en Malasia se utilizan tradicionalmente para tratar la hipertensión, la diabetes y aliviar el dolor, en Bolivia se utilizan para tratar la leishmaniasis y para inducir el aborto, en Indonesia para el tratamiento de la diabetes, la hipertensión y la malaria. La corteza se utiliza como astringente para las heridas y en ocasiones para el bronceado (Maiti et al., 2007a-2007b-2007c; Moghadamtousi et al., 2013; Balijepalli et al., 2015).

Investigaciones fitoquímicas con extractos a partir de acetona, etanol y metanol han demostrado que los limonoides y sus derivados son los principales constituyentes de *S. macrophylla*. Los limonoides derivan de triterpenos tetracíclicos similares a eufol (H-20 β) o tirucalol (H-20 α) por una serie de cambios oxidativos, intercalados con reordenamientos moleculares (Cheng et al., 2014). Los tetranortriterpenoides es un nombre alternativo para los limonoides porque en el proceso de cambios oxidativos, la cadena lateral es oxidada a un anillo de β -furfano sustituido por la pérdida de cuatro átomos de carbono (Moghadamtousi et al., 2013; Cheng et al., 2014). Se han estudiado principalmente los limonoides de sus semillas (Mootoo et al., 1999); en sus hojas se han encontrado hidratos de carbono, flavonoides libres y/o combinados, esteroides y/o triterpenos, así como taninos hidrolizables y condensados, aceites esenciales como Himacaleno- γ , Germacreno -D, germacreno-A, dieno-1,4-cadina, ácido decahexanoico y etil hexadecanoato, además de limonoides tipo pragmalina del extracto diclorometanólico de hojas, denominados “Swietefragmina” H-J (1–3) y “Swietemacrofina”; y de su corteza se han aislado tres compuestos con actividad antioxidante, el fenilpropanolide sustituido catequina (Swietemacrofilanina), la catequina, y una epicatequina; todos con actividad antioxidante (Falah et al., 2008; Tan et al., 2009; El Zalabani et al., 2012).

El extracto etanólico de hojas de *S. macrophylla* obtuvo resultados prometedores en un estudio *in vitro* donde se evaluó la inhibición de las miotoxinas del veneno de *B. asper*, *B. atrox* y la Crotoxina de *C. durissus cumanensis*, por plantas con actividad antioxidante conocida, adicionalmente, no presentó toxicidad para las células musculares en cultivo. Este extracto, inhibió el 60% de la citotoxicidad *in vitro* inducida por una fracción rica en PLA₂ del veneno de *B. asper* cuando fue pre-incubado previamente (Pereañez et al., 2011). En el mismo estudio se encontró que las hojas poseen gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales probablemente estén implicados en la actividad inhibitoria de las fosfolipasas A₂ como se ha descrito anteriormente (Lindahl and Tagesson, 1997).

En otro estudio realizado *in vitro* e *in vivo* con el extracto de las hojas de *S. macrophylla*, se evaluó la actividad de diferentes fracciones del extracto contra la PLA₂ Lis49 de *B. atrox*, y contra PLA₂ Asp49 de *B. asper* y *C. durissus cumanensis*. De las fracciones aisladas solo la “Sm13-26” inhibió satisfactoriamente las toxinas, el mejor porcentaje de inhibición *in vitro* (>80%) lo presentó contra la PLA₂ Lis49 de *B. atrox*, el cual fue dosis dependiente. Cuando se pre-incubó la fracción con la toxina, la miotoxicidad se inhibió en más del 90% en razón 1:10 (toxina:fracción), sin embargo cuando se administró de forma independiente; es decir aplicando la toxina y segundos después la fracción, la inhibición fue del 50%, siendo un porcentaje de inhibición significativo (Pereañez et al., 2013).

En estudios previos se ha descrito que la catequina; un tanino presente en el extracto y presumiblemente en la fracción “13-26” de *S. macrophylla*, presenta actividad inhibitoria *in vitro* e *in vivo* del veneno de algunas especies de Vipéridos y Elápidos, así como la neutralización de PLA₂ presentes en estos venenos (Pithayanukul et al., 2010; Xu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Mourão et al., 2014).

Los estudios de toxicidad de esta planta son limitados y solo se reportan con extractos de las semillas. En el estudio de Naveen et al., (2014) describen la toxicidad aguda oral en ratones de las semillas de *Swietenia mahagoni*, donde no se observaron lesiones sugerentes de toxicidad en órganos a dosis de 25, 200, 2000, 5000mg/kg, lo que sugiere que es un extracto de toxicidad baja. En un estudio reciente, evaluaron la toxicidad aguda oral en ratas del extracto de semillas de *Swietenia macrophylla* a 2000mg/kg, los resultados muestran que las semillas no produjeron diferencias significativas en el peso, consumo de agua y alimento, parámetros bioquímicos y hematológicos, ni alteraciones macroscópicas e histopatológicas en los órganos de los animales tratados respecto a los controles (Balijepalli et al., 2015).

4 CUERPO DEL TRABAJO.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Antioquia, en el acta Nro.87 del 30 de Enero de 2014.

4.1 CUMPLIMIENTO DEL OBJETIVO 1: TOXICIDAD AGUDA ORAL DE LA FRACCIÓN “SM 13-26” DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *Swietenia macrophylla*

4.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1.1.1 Preparación de la fracción

La fracción “Sm13-26” fue obtenida por el método utilizado por Pereañez et al., (2013), a partir del extracto de hojas de *Swietenia macrophylla* y fue congelada hasta su uso. Para su preparación, previa a la administración en los animales, se diluyó con etanol y se agitó en el vortex por tres minutos, posteriormente se llevó al ultrasonido durante siete minutos, se filtró por una membrana de 0,2 µm, se secó en SpeedVac (Vacufuge plus, Eppendorf). Posteriormente se diluyó con solución salina estéril (SSF) al 0,9% (Baxter, Colombia); en un volumen de acuerdo a la concentración de extracto requerida, nuevamente se agitó en el vortex durante tres minutos y se llevó al ultrasonido por siete minutos antes de administrarse a los animales.

4.1.1.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) cepa Swiss Webster convencionales, hembras de cinco a seis semanas de edad, entre 20 y 25 gramos de peso corporal. Los animales pertenecían al Bioterio de la Sede de Investigación Universitaria, se mantuvieron con luz artificial y un fotoperiodo de 12 horas, temperatura de 22±1 °C y humedad relativa de 60±4 %. Previo a cada

experimento se realizó un periodo de adaptación al ambiente de cinco días, con una dieta similar y en condiciones de alojamiento y ambientales similares.

4.1.1.3 Dosis y administración del extracto

Para determinar la toxicidad aguda oral del extracto se siguieron los parámetros descritos en la guía N°423 de 2001 de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD). Se utilizaron 5 ratones hembras como grupo tratamiento y 5 como grupo control. Se realizaron dos ensayos, el primero fue un ensayo límite con una dosis 2000 mg/kg y el segundo con la dosis inmediatamente inferior 300mg/kg. El grupo tratamiento recibió la fracción diluida en 0,2mL de SSF y se administró con sonda orogástrica. El grupo control recibió únicamente 0,2mL de SSF vía oral. Previo a la administración oral se realizó un ayuno de sólidos de cuatro horas que se postergó hasta una hora después de administrar el compuesto. Como se plantea en la guía de la OECD, todos los animales se observaron permanentemente durante la primera hora tras la administración de la fracción, luego cada 2 horas durante el primer día y las observaciones siguientes se realizaron diariamente durante 14 días. Se realizó un seguimiento del comportamiento, peso y estado clínico de cada ratón, el cual se consignó en un formato de seguimiento individual (Anexo 1). Durante la observación de los animales se detalló el estado de conciencia, la condición corporal, la presencia de piloerección, estupor o letargo y alteraciones en los sistemas orgánicos. Finalmente, al día 14 se realizó la eutanasia con CO₂ y se realizó la necropsia, donde se detallaron los hallazgos macroscópicos en un formato individual (Anexo 2). Los órganos que se colectaron para el análisis histopatológico fueron estómago, intestino delgado, colon, bazo, hígado, pulmones, riñones, corazón, cerebro y músculo gastrocnemio derecho. Las muestras se fijaron en formalina bufferada al 10%, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4µm de espesor. Todos los tejidos se tiñeron con Hematoxilina Eosina (H-E) (García del Moral, 1993). Para el análisis histopatológico, los cortes se evaluaron en un microscopio óptico Leica DMLB (Meyer Instruments, Houston, TX, USA) y a las lesiones observadas se les dio una valoración semi-cuantitativa (Tabla 1), valores que se consignaron en el formato de evaluación histopatológica (Anexo 3). Todas las

muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia.

Tabla 1. Escala de medición de las variables histopatológicas con Hematoxilina-Eosina

Escala	Interpretación de la lesión	Extensión
1	Sin lesión	No presencia
2	Lesión leve	Focal, 15% del tejido afectado
3	Entre leve y moderada	Focal, compromiso del 15-35% del tejido
4	Moderada	Multifocal, compromiso del 35-50% del tejido
5	Entre moderada y severa	Multifocal, compromiso del 65-85% del tejido
6	Severa	Extensa, difusa, compromiso 85-100% del tejido

4.1.1.4 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre los grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Withney y ANOVA de mediciones repetidas. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se procesaron en el Software SPSS (IBM, Statistic Version 20).

4.1.2 RESULTADOS

4.1.2.1 Seguimiento clínico de los animales y necropsia

Durante el seguimiento realizado a los animales, no se observaron muertes ni alteraciones en los parámetros clínicos o comportamentales de los animales a ninguna de las dosis evaluadas. En la Figura 1 y Figura 2 se evidencia que a dosis de 2000mg/kg, la fracción indujo variaciones estadísticamente significativas en el peso de los animales ($p=0,034$), hecho que no se observó a dosis de 300mg/kg ($p=0,208$). En la necropsia no se evidenciaron alteraciones macroscópicas en los órganos en ninguna de las dosis administradas.

Tabla 2. Parámetros de las observaciones clínicas y comportamentales de los animales durante el experimento (2000 y 300mg/kg)

SISTEMA ORGÁNICO	OBSERVACIÓN Y EXAMEN	SIGNOS COMUNES DE TOXICIDAD	2000 mg/kg ¹	300 mg/kg ¹
Sistema Nervioso Central	Comportamiento	Agresividad inusual, hiperactividad, sedación.	0	0
	Movimientos	Temblores, ataxia, catatonía, parálisis, convulsión.	0	0
	Reactividad a varios estímulos	Irritabilidad, pasividad, anestesia, hiperestesia	0	0
	Tono Muscular	Rigidez o flacidez	0	0
Respiratorio	Narinas	Secreción	0	0
	Patrón respiratorio	Bradipnea, disnea	0	0
Cardiovascular	Inspección	Hemorragias	0	0
Gastrointestinal	Observación de la cama y manipulación	Diarrea, constipación	0	0
	Consistencia de las heces	Diarreicas, melenas	0	0
Genitourinario	Vulva, glándulas mamarias	Hinchazón	0	0
	Pene	Prolapso	0	0
	Región perineal	Sucia	0	0
Piel y pelaje	Color, turgencia e integridad	Enrojecimiento, erupciones, piloerección	0	0
Membranas y mucosas	Cavidad oral y conjuntiva	Congestión, hemorragia, cianosis,	0	0
Ojos	Párpados	Ptosis	0	0
	Globo ocular	Exoftalmos, nistagmo	0	0
	Transparencia	Opacidad	0	0
Otros	Postura	Cifosis, lordosis	0	0
	Condición corporal	<3/5	0	0
	Estado de conciencia	Somnolencia, estupor, coma	0	0

¹ Grado de severidad: Sin lesión = 0, leve = 1, moderada = 2, grave = 3.

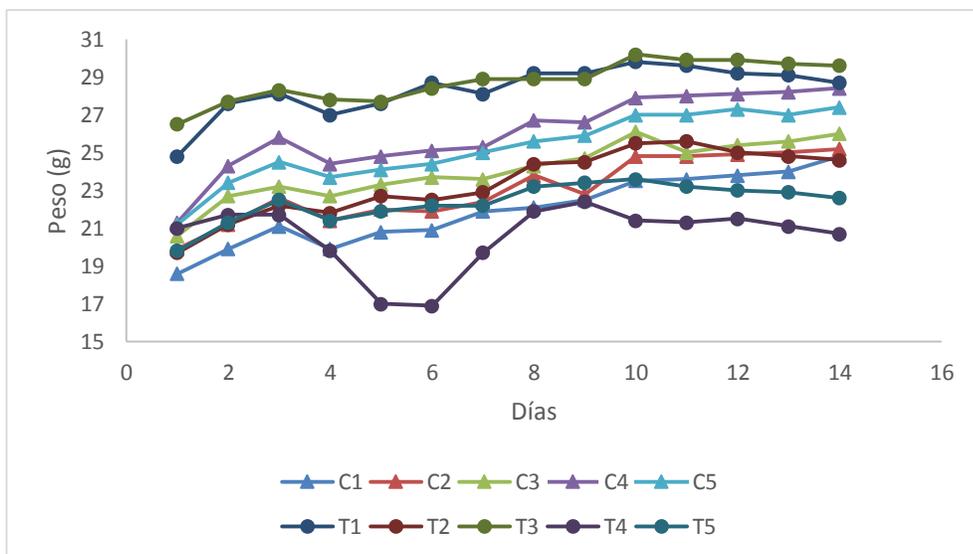


Figura 1. Seguimiento del peso corporal (g) en los animales no tratados (C) y tratados (T) con la dosis de 2000mg/kg (n=10).

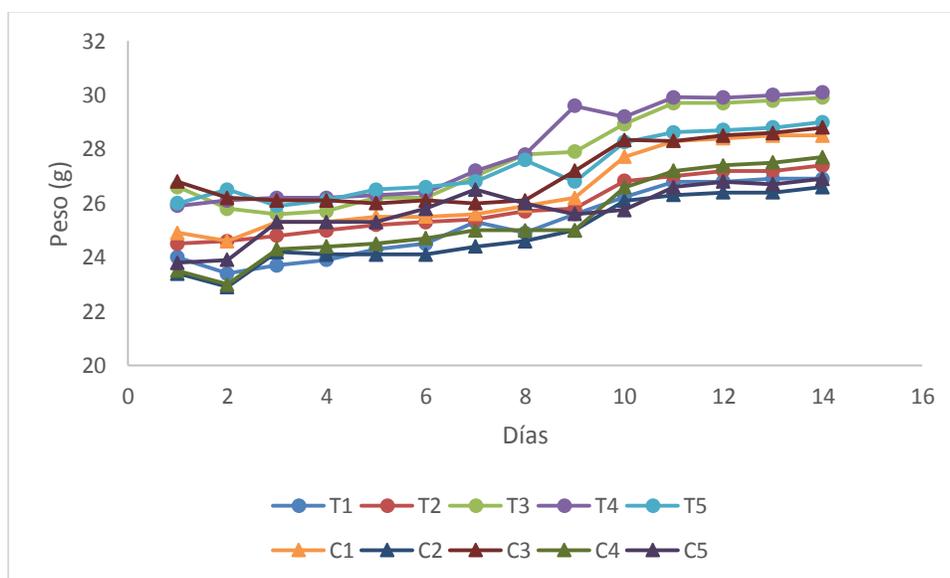


Figura 2. Seguimiento del peso corporal (g) en los animales tratados (T) con la dosis de y no tratados (C) con la dosis de 300mg/kg (n=10).

4.1.2.2 Hallazgos histopatológicos

Se encontró que la fracción "Sm13-26", a dosis de 2000mg/kg incrementó de forma significativa la cariomegalia ($p=0,004$) y la binucleación ($p=0,007$) de los hepatocitos en todos los animales tratados ($n=5$), respecto a los controles (Figura 3). A esta misma dosis, en los riñones indujo necrosis tubular leve en un animal

(14%) y degeneración turbia leve (34%); lesiones que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,138$ y $p=0,056$, respectivamente). En los demás órganos evaluados no se observaron lesiones. En los animales del grupo control no se evidenciaron lesiones. En la tabla 3 se describe la lesión encontrada en cada órgano y la extensión de los hallazgos histopatológicos.

A dosis de 300mg/kg no se observaron lesiones histopatológicas en ningún órgano de los animales tratados. Los animales del grupo control no presentaron lesiones.

Tabla 3. Hallazgos histopatológicos de los animales tratados vía oral con 2000mg/kg de la fracción Sm13-26 (n=5)

Órgano	Hallazgos
Hígado	Cariomegalia (34% leve, 50% entre leve y moderada y 16% moderada) Binucleación (16% sin lesión, 50% leve y 34% entre leve y moderada)
Riñón	Necrosis tubular leve (14%) Nefrosis tubular leve (34%)
Estómago-ID-IG-	Sin lesiones significativas
Gastrocnemio-	Sin lesiones significativas
Pulmón-Bazo-	Sin lesiones significativas
Cerebro-Corazón	Sin lesiones significativas

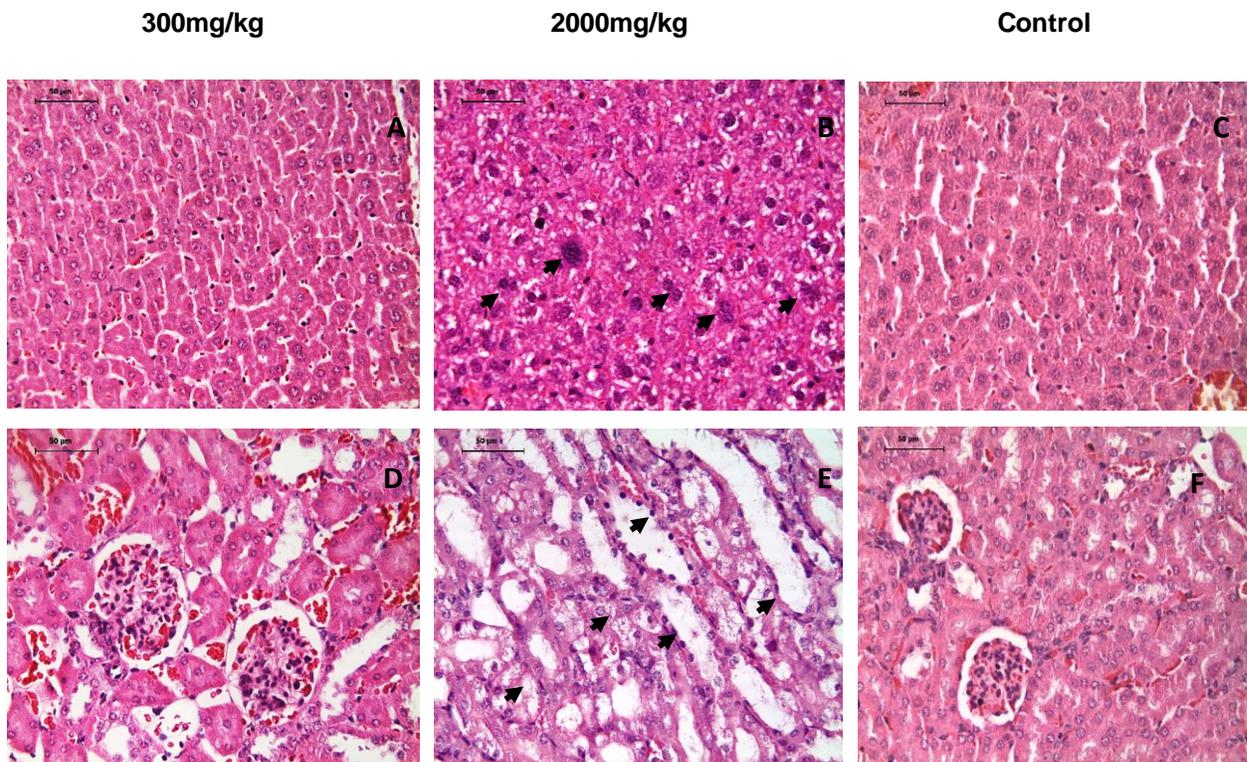


Figura 3. Detalle del hígado (A y B) y riñón (D y E) entre las diferentes dosis evaluadas de Sm13-26. A y D: 300mg/kg, B y E: 2000mg/kg, C y F: Controles. En la figura B, las flechas señalan la cariomegalia y binucleación observada a esa dosis. En la figura E, las flechas señalan el área de necrosis tubular y de nefrosis. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E, 400x).

4.1.3 DISCUSIÓN

La fracción Sm 13-26 del extracto de hojas de *Swietenia macrophylla* no produjo la muerte, ni signos clínicos de toxicidad aguda oral en ratones a dosis de 2000mg/kg y 300mg/kg. La dosis de 2000mg/kg indujo variaciones en el peso de los animales y aunque no se observaron lesiones macroscópicas en la necropsia, en los hallazgos histopatológicos se encontró aumento en la cariomegalia y binucleación de los hepatocitos respecto a los controles, así como nefrosis y necrosis tubular leve en algunos de los animales tratados.

Un incremento en la poliploidia de los hepatocitos puede ocurrir con la edad, en donde el número de cromosomas puede incrementar de 16 a 32, por esto, la

cariomegalia, anisocariosis y policaria o multinucleaciones son hallazgos incidentales en roedores (Percy y Barthold, 2007). No obstante su aumento se relaciona con condiciones regenerativas o degenerativas, mientras que la cariomegalia o megalocitosis puede asociarse con xenotoxicidad por compuestos que impiden la regeneración, pero que no son necrotizantes (Maxie et al., 2007). La nefrosis vacuolar y la necrosis tubular renal son lesiones sugerentes de nefrotoxicidad (Maxie et al., 2007), y en este caso podría estar relacionada con el contenido de taninos en la fracción Sm 13-26.

En rumiantes y ocasionalmente en equinos, la ingestión de grandes cantidades de taninos puede causar hidrotórax, ascitis, edema perirrenal, ulceración del tracto alimentario, necrosis tubular aguda y muerte; aunque en lesiones menos graves grupos adyacentes de túbulos renales presentan grados variables de degeneración (Maxie et al., 2007); hallazgos que se evidenciaron en este estudio. Una de las sustancias responsables de la toxicidad de algunas plantas son los galotaninos, los cuales se hidrolizan a ácido gálico, ácido tánico y pirogalol, metabolitos responsables de la toxicidad (Maxie et al., 2007). En el estudio realizado por Pereañez et al., (2013) se encontró que la fracción “Sm13-26” está constituida por compuestos fenólicos como flavonoides, leucoantocianidinas y taninos.

En este estudio no se observaron lesiones tan severas como las descritas en la intoxicación con taninos en rumiantes y equinos, lo que sugiere que la fracción “Sm13-26” no posee un contenido alto de estos compuestos a las dosis administradas. Adicionalmente, a los compuestos fenólicos, como los presentes en esta fracción, se les atribuyen baja toxicidad (Stohs, 2013), lo que correlaciona con los hallazgos en este experimento.

Teniendo en cuenta los resultados de este estudio y de acuerdo a lo establecido por la OECD, la fracción Sm 13-26 es un compuesto con categoría de toxicidad 5 (>2000-6000mg/kg), lo que indica que el peligro de toxicidad aguda oral es bajo.

Finalmente, se considera que es importante caracterizar a profundidad los compuestos que constituyen la fracción Sm13-26, con el fin de dilucidar exactamente su potencial farmacológico y tóxico.

4.2 CUMPLIMIENTO PARCIAL DEL OBJETIVO 3: INHIBICIÓN DE LOS EFECTOS DE LA PLA₂ LIS49 DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LA FRACCIÓN “SM 13-26” AL ADMINISTRARSE VÍA ORAL COMO PRE-TRATAMIENTO

4.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1.1 Purificación de la toxina

El veneno fue obtenido de especímenes de *Bothrops atrox* adultos que permanecen en cautiverio en el Serpentario de la Universidad de Antioquia. El veneno fue extraído manualmente, centrifugado, liofilizado y congelado a -70°C hasta su uso. Para el aislamiento de la PLA₂ Lis49, se utilizó una muestra de 400mg de veneno disuelto en 3mL de Tris (0,05M) y Cloruro de Potasio (KCl 0,1 M) a pH 7,0. La muestra se inyectó a una columna Sephadex C-25- Carboximetilo. Las proteínas fueron eluidas empleando un gradiente de 0.1 a 0.75 M de KCl a 1mL/min; el perfil de elución fue monitoreado a 280 nm. Se obtuvieron 6 fracciones, de las cuales se colectó la fracción seis, correspondiente a la PLA₂ de acuerdo a lo descrito por Núñez et al., (2004a). Posteriormente se dializó, se secó y se evaluó su pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida sodio-duodecil-sulfato (SDS-PAGE) al 12% en un sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad); adicionalmente se realizó cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) empleando una columna C18 (ResteK) y un cromatógrafo Shimadzu. La proteína fue eluída empleando un gradiente lineal de acetonitrilo de 0 a 66% (v/v) con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). La pureza se determinó empleando como solvente A el TFA al 0.1% y como solvente B el acetonitrilo con las siguientes condiciones de corrida; 5 min 0% solvente B, 5 a 20 min gradiente

de 0 a 70 % con el solvente B y 5 min 70% de solvente B. La lectura se realizó a 215 nm.

4.2.1.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) Swiss Webster convencionales, de cinco a seis semanas de edad, hembras y machos, entre 20 y 25 gramos de peso corporal. Los animales pertenecían al Bioterio de la Sede de Investigación Universitaria, se mantuvieron con luz artificial y un fotoperiodo de 12 horas, temperatura de 22 ± 1 °C y humedad relativa de 60 ± 4 %. Previo a cada experimento se realizó un periodo de adaptación al medio de cinco días. Todos los animales recibieron tratamiento analgésico con Tramadol (Laboratorio Farmacéutico Vitalis, Bogotá, Colombia) a dosis de 31,6 mg/kg vía SC como única dosis previo a la administración de la toxina. Durante la aplicación de los tratamientos o la toma de muestras, los animales fueron anestesiados con vapores de Isoflurano (Piramal Healthcare Limited, Andhra Pradesh, India). La eutanasia se realizó con CO₂; la mitad de cada grupo experimental se sacrificó a las 24 horas y los restantes a las 48 horas; a todos los animales se les realizó necropsia inmediata.

4.2.1.3 Administración de tratamiento oral

Para este experimento se utilizaron tres grupos de seis ratones cada uno; los grupos uno y dos recibieron la fracción Sm 13-26 de *Swietenia macrophylla* (50µg/g en 0,2mL SSF) vía oral con sonda orogástrica, cada 24 horas durante 4 días y el grupo tres recibió 0,2mL de SSF con la misma frecuencia de los grupos uno y dos. El día cuarto, 60 minutos después de la administración del tratamiento, los grupos uno y tres recibieron una inyección de la PLA₂ Lis49 del veneno de *Bothrops atrox*, (20µg/50µL SSF) en el músculo gastrocnemio derecho y el grupo dos recibió una inyección de 50µL de SSF en el músculo gastrocnemio derecho. Todos los animales fueron observados durante la primera media hora. Tres horas después se les tomó una muestra de sangre que se colectó en capilares heparinizados; finalmente la eutanasia se realizó a las 24 y 48 horas posteriores a

la administración de la toxina y durante la necropsia se tomaron muestras del músculo gastrocnemio, de la piel del sitio de inyección, del corazón y de los riñones. Los hallazgos de la necropsia se consignaron en un formato individual (Anexo 2).

4.2.1.4 Actividad de la Creatina-kinasa (CK)

Las mediciones se hicieron empleando un kit CK-NAC (Wiener Laboratorios, Colombia). Después de centrifugar las muestras, se obtuvo el suero obtenido a partir de 100 μ L de sangre extraída de la vena coccígea de cada animal. Los valores se expresaron en U/L (unidades/litro).

4.2.1.5 Análisis Histopatológico

Las muestras de los tejidos se fijaron en formalina bufferada al 10%, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4 μ m de espesor. Los tejidos se tiñeron con Hematoxilina Eosina, H-E y el músculo además se coloreó con Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica, HAF (García del Moral, 1993). El procesamiento y la lectura de las muestras se realizaron en el laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia. Para el análisis histopatológico, los cortes se evaluaron en un microscopio óptico Leica DMLB (Meyer Instruments, Houston, TX, USA) y a las lesiones observadas se les dio una valoración semi-cuantitativa (Tabla 1), hallazgos que se consignaron en el formato de análisis histopatológico (Anexo 4). Con la coloración con Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica se determinó el grado de pérdida de estriaciones del tejido muscular y lisis celular.

4.2.1.6 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre los grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Withney. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron en el Software SPSS (IBM, Statistic Version 20).

4.2.2 RESULTADOS

4.2.2.1 Administración oral de la fracción y la toxina

Durante el tiempo que se administró la fracción “Sm13-26” vía oral, no se observaron cambios en el comportamiento ni en el estado clínico de los animales en ningún grupo. En los grupos que recibieron la inyección de la miotoxina, se observó edema leve en el miembro afectado a las 24 horas, pero no a las 48 horas, independiente de que hubiesen recibido el tratamiento.

4.2.2.2 Actividad de la Creatina-kinasa (CK)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,631$) en los niveles de Creatina-kinasa (CK) entre el grupo que recibió el tratamiento oral con la fracción “Sm13-26” (grupo 1) y el grupo que solo recibió la miotoxina (grupo 3), lo cual indica que la fracción Sm13-26 administrada por vía oral como pretratamiento, no logró reducir la mionecrosis ocasionada por la toxina. En el grupo que solo recibió el extracto (grupo 2) no se observó aumento de la CK (Figura 4).

4.2.2.3 Hallazgos histopatológicos

Los hallazgos histopatológicos en el músculo a las 24 horas ($n=3$) indicaron mionecrosis tóxica entre moderada y severa en todos los animales que recibieron la miotoxina (

Figura 5 y Figura 6), independiente de que hubiesen recibido el tratamiento ($p=0,575$). Respecto a las demás variables, como la degeneración hialina de las fibras musculares ($p=0,176$), el edema ($p=1,000$) y la inflamación ($p=0,932$), no se observaron diferencias marcadas entre los grupos. En los animales que se sacrificaron a las 48 horas ($n=3$), se observó reparación del músculo en fase temprana, con predominio de macrófagos y neutrófilos fagocitando las fibras necróticas, así como la proliferación de células satélite miogénicas, fibroblastos

hipertróficos y aumento en el número de mitosis (Figuras 5B y 5D). Estos hallazgos no se relacionaron con la administración de la fracción.

En la piel se observó dermatitis exudativa leve, independiente de que hubiesen recibido el extracto como tratamiento. En el corazón y en el riñón no se evidenciaron lesiones significativas ni diferencias entre grupos.

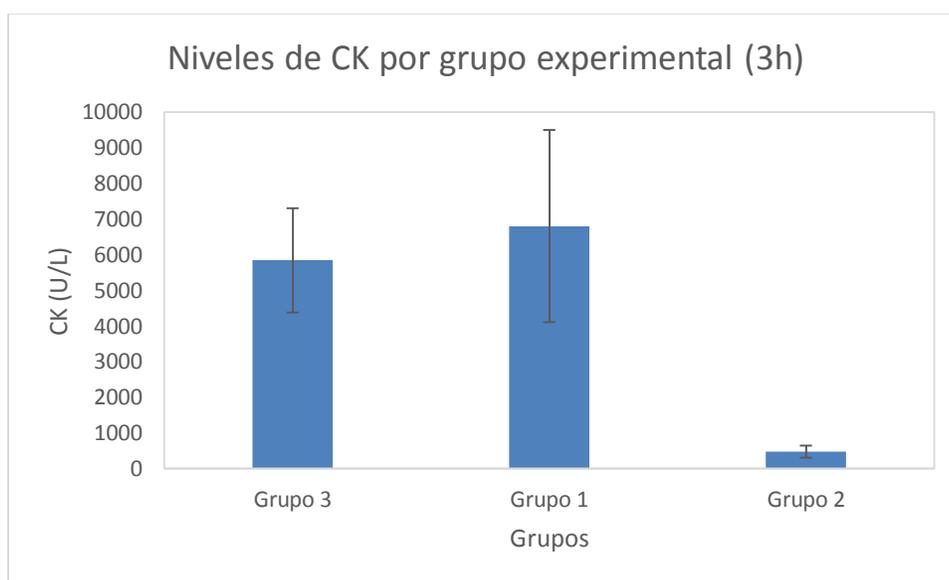


Figura 4. Niveles séricos de la enzima Creatina-kinasa a las tres horas post-aplicación de la miotoxina PLA₂ Lis49 en ratones Swiss Webster (n=18).

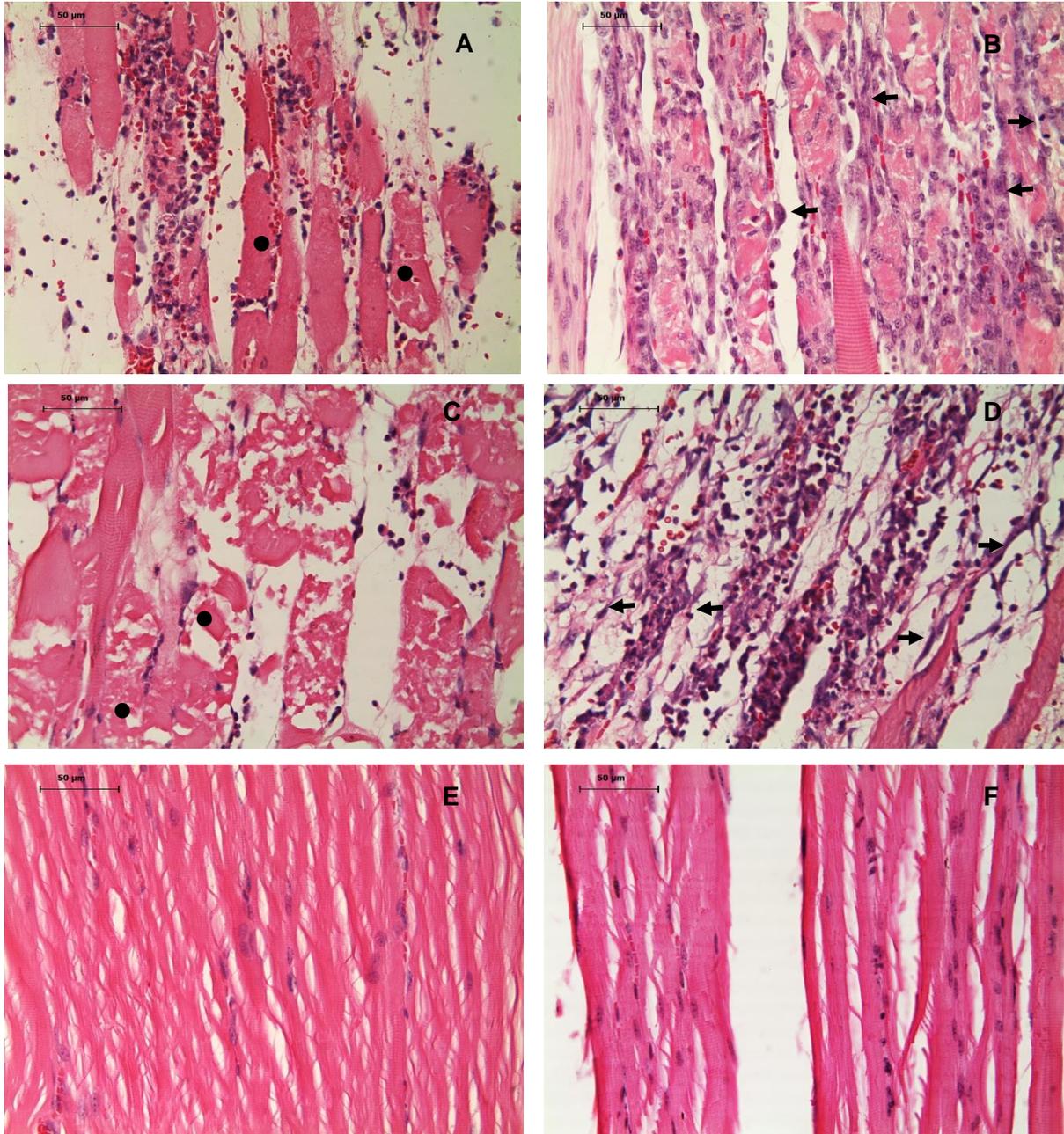


Figura 5. Fragmentos del músculo gastrocnemio a las 24 y 48 horas después de la inyección de la PLA₂ Lis49, tras recibir un pretratamiento oral con la fracción Sm13-26 o solución salina. Figuras A, C y E 24 horas, B, D y F a las 48 horas. Note la necrosis y la fagocitosis por neutrófilos a las 24

horas (●), mientras que a las 48 horas predominan los macrófagos que fagocitan los restos de fibras necróticas y la proliferación de células satélite miogénicas y de fibroblastos (cabeza de flechas). A y B: Tratamiento con la fracción “Sm13-26” (grupo 1); C y D: Toxina (grupo 3); E y F: Controles (grupo 2). Tinción H-E, 400X.

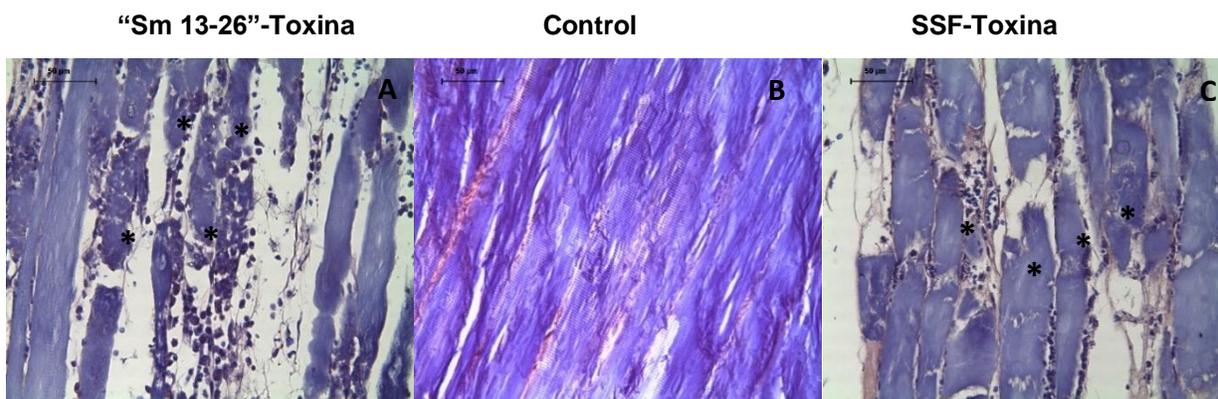


Figura 6. Fragmentos del músculo gastrocnemio a las 24 horas después de la inyección de la PLA₂ Lis49, tras recibir un pretratamiento oral con la fracción Sm13-26 o solución salina. El * señala las áreas de necrosis de las fibras, notese que no hay diferencias entre las figuras A y C. A: Tratamiento con Fx”Sm13-26” (grupo 1) , B: Control (grupo 2), C: Toxina (grupo 3). Tinción HAF, 400X.

4.2.3 DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que al administrar la fracción Sm 13-26 vía oral en dosis repetidas previo a la inyección de la miotoxina PLA₂ Lis 49, no se lograron inhibir los efectos tóxicos ocasionados por esta. No obstante, en el estudio realizado por Pereañez et al., (2011) se encontró que el extracto etanólico de hojas de *Swietenia macrophylla* inhibió el 60% de la citotoxicidad *in vitro* inducida por una fracción rica en PLA₂ del veneno de *Bothrops asper* cuando fue pre-incubado con el extracto.

En otro estudio posterior, después de fraccionar este extracto, se encontró que la fracción “Sm13-26” inhibió satisfactoriamente la PLA₂ Lis49 de *Bothrops atrox* y la PLA₂ Asp49 de *Bothrops asper* y *Crotalus durissus cumanensis* *in vitro* e *in vivo*. La fracción Sm 13-26 inhibió en más del 90% la actividad miotóxica de PLA₂ Lis49

de *B. atrox in vitro* (pre-incubando la fracción con la toxina en relación 10:1); sin embargo cuando se administró la fracción *in situ* segundos después de la inyección de la miotoxina, la inhibición de la miotoxicidad fue del 50% (Pereañez et al., 2013).

Pereañez et al., (2013) describe que la fracción “Sm 13-26” es rica en flavonoides, leucoantocianidinas y taninos. Diversos estudios sugieren que la inhibición de las PLA₂s por los compuestos fenólicos está dada por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del anillo aromático del compuesto, con los aminoácidos de la toxina, lo que interfiere en la capacidad de ligar calcio y no permite que ejerza su actividad tóxica. Adicionalmente, se propone que estos compuestos interactúan con la toxina mediante puentes hidrofóbicos mediados por anillos aromáticos (Chandra et al., 2002; Ticli et al., 2005; Da Silva et al., 2009; Pereañez et al., 2011). También se ha propuesto que los taninos como la catequina, precipitan las proteínas de los venenos mediante la quelación de iones metálicos divalentes como Calcio y Zinc, necesarios para la actividad de algunas de estas toxinas, como es el caso de las PLA₂ (Pithayanukul et al., 2010; Xu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Mourão et al., 2014).

Existen diversos trabajos experimentales donde se han utilizado extractos de plantas como pretratamiento para el envenenamiento por diversas especies de serpientes. En el estudio realizado por Fung et al., (2009) se evaluó el extracto de *Mucuna pruriens* frente al veneno de la cobra de Malasia (*Naja sputatrix*), el cual se administró como pretratamiento intraperitoneal semanalmente durante 21 días, y presentó efectos protectores frente al veneno ya que neutralizó su actividad letal. En el estudio de Tan et al., (2009), donde se evaluó el mismo extracto como pretratamiento intraperitoneal frente a los venenos de *Calloselasma rhodostoma*, *Naja sputatrix*, *Ophiophagus hannah*, *Bungarus candidus* y *Vipera russelli*, se encontró que solo inhibió parcialmente la actividad letal del veneno de *C. rhodostoma* y *N. sputatrix*, mientras que para el veneno de *O. hannah*, *B. candidus* y *V. russelli* solo prolongó el tiempo de sobrevida. Patiño et al., (2012)

encontraron que el extracto de *Renealmia alpinia* como pretratamiento intraperitoneal tiene efectos protectores frente al veneno de *Bothrops asper* ya que inhibió su actividad letal. En el estudio de Ode y Asuzu (2006) al administrar el extracto de *Crinum jagus* vía oral 30 minutos antes de la inyección del veneno, mostró protección parcial contra los efectos letales del veneno de *Echis ocellatus* y *Bitis arietans* pero no para el veneno de *Naja nigricollis*.

En estudios experimentales relacionados con los efectos locales del veneno, como el realizado por Mourão et al., (2014), donde se utilizó el extracto de *Bellucia dichotoma* como inhibidor de los efectos locales del veneno de *Bothrops atrox*, se observó disminución parcial de los efectos locales cuando se administró el pretratamiento oral; mientras que cuando se pre-incubó el extracto con el veneno la inhibición fue del 100%, lo que indica que la actividad quelante de iones de estos extractos se favorece durante la pre-incubación y no es completa cuando se administra como pretratamiento oral.

Los mecanismos de acción propuestos para los compuestos fenólicos frente a las toxinas de serpientes, indican que estos metabolitos con potencial terapéutico deben administrarse por vía intramuscular o local, donde se garantice su biodisponibilidad de forma rápida en el sitio de la mordedura, y se permita que estos compuestos formen complejos estables de forma rápida con las toxinas que tienen efectos locales; como es el caso de la PLA₂ Lis49, antes de que ejerzan su actividad tóxica.

4.3 CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS 2 Y 3: ARTÍCULO PARA PUBLICACIÓN

“Reducción de la mionecrosis ocasionada por la PLA₂ homóloga del veneno de *Bothrops atrox* (Viperidae) por el extracto de *Bixa orellana* L. (Bixaceae)”

Con el artículo que se expone a continuación, se detalla el cumplimiento del objetivo dos; “Determinar si el extracto de *Bixa orellana* posee efecto inhibitorio de la mionecrosis local inducida por la fosfolipasa A₂ homóloga del veneno de *Bothrops atrox* tras la aplicación local de este extracto”, y parte del objetivo tres; “Determinar si el extracto de *Bixa orellana* y la fracción “Sm13-26” del extracto de *Swietenia macrophylla* poseen efecto quimiopreventivo de los efectos tóxicos inducidos por una miotoxina del veneno de *Bothrops atrox*”.

Ana María Henao Duque^{1*}, Berardo de Jesús Rodríguez², Vitelbina Núñez Rangel^{1,3}

¹ Programa de Ofidismo/Escorpionismo, Universidad de Antioquia UdeA; Calle 70 No.52-21, Medellín, Colombia.

² Grupo de Patobiología Quirón. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia UdeA; Calle 70 No.52-21, Medellín, Colombia.

³ Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia UdeA; Calle 70 No.52-21, Medellín, Colombia.

* Corresponding author, ana.h.cat@gmail.com

4.3.1 RESUMEN.

En Colombia los accidentes ofídicos son causados principalmente por víboras del género *Bothrops*, ocasionando anualmente secuelas locales en un 6 a 10% de los pacientes afectados. Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) miotóxicas son uno de los principales componentes del veneno de estas víboras, generan mionecrosis extensa, edema, hiperalgesia en inflamación en el sitio de la mordedura. Los extractos de plantas son fuente de recursos farmacológicos con estudios limitados

que son utilizados ampliamente por la medicina tradicional para tratar dolencias como las causadas por el accidente ofídico. El extracto de hojas de *Bixa orellana* ha neutralizado algunos de los efectos del veneno de *Bothrops asper/atrox in vitro*. En este estudio se evaluó dicho extracto administrándolo *in situ* como tratamiento, y vía oral como pre-tratamiento inhibidor de los efectos de una miotoxina del veneno de *B. atrox in vivo*, empleando la medición de la enzima creatina-kinasa y el análisis histopatológico. Los resultados muestran que la aplicación del extracto *in situ*, después de la inyección de la toxina disminuyó la mionecrosis local en un 38-60% de forma significativa ($p=0.009$). No obstante, al administrar el extracto oral como pre-tratamiento no se inhibió la mionecrosis ($p=0.522$). Estos resultados demuestran el potencial de este extracto como fito-terapéutico local y posible adyuvante a la terapia con antivenenos. Se sugieren estudios experimentales y clínicos que permitan evaluar a profundidad este extracto, teniendo en cuenta que en análisis preliminares se ha encontrado que tiene bajo potencial tóxico y su uso medicinal externo está aprobado en Colombia.

Palabras clave: Accidente ofídico, *Bixa orellana*, extractos, fosfolipasas A_2 , víbora.

4.3.2 INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es un problema de salud pública que afecta las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó dicho evento como una enfermedad tropical desatendida (WHO, 2009). En Colombia, se reportaron 4303 casos en el año 2014, sin embargo debido al alto índice de subregistro se estima que esta cifra sea mucho mayor (Sivigila, 2014).

En Colombia hasta el 95% de los accidentes son ocasionados por víboras, donde *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* ocasionan cerca del 70% de dichos accidentes (Otero et al., 2002, Walteros et al., 2014). Sus venenos generan efectos locales y sistémicos como: edema, mionecrosis, hemorragia, alteraciones de la coagulación, nefrotoxicidad, entre otros. Además, se estima una mortalidad del 3-5% y secuelas

en el 6-10% de los casos, principalmente como resultado de la dermonecrosis y la mionecrosis en el sitio de la mordedura (Otero, 2009).

Entre los componentes responsables de este efecto están las PLA₂, las cuales representan entre el 24 y 45 % del veneno de *B. asper* y *B. atrox* (Angulo y Lomonte, 2009; Núñez et al., 2009). Las PLA₂ presentes en estos venenos pueden ser enzimáticamente activas si presentan un Aspartato en la posición 49 y se les conoce como ASP49; por el contrario las que presentan una Lisina en esa misma posición son enzimáticamente inactivas y se les llama LYS 49 o fosfolipasas homólogas. Estas últimas, a pesar de no degradar los fosfolípidos de las membranas, inducen alteraciones en la célula muscular generando mionecrosis y edema local (Gutiérrez, 2002), además de infiltración leucocitaria moderada e hiperalgesia (Núñez et al., 2004a; Lomonte y Rangel, 2012).

El antiveneno es el único tratamiento eficaz que neutraliza la acción del veneno, sin embargo, la neutralización de los efectos que se producen a nivel local es limitada, debido a que estos se desarrollan en minutos y a que algunos componentes de los venenos no inducen una adecuada respuesta inmunológica, lo que genera la presencia limitada de anticuerpos en el antiveneno, resultando en una pobre neutralización de algunos de los efectos locales (Rucavado et al., 2012). Por otro lado, existen múltiples factores extrínsecos que contribuyen a la ineficacia del tratamiento para contrarrestar las lesiones locales, como es el retraso en la administración de la terapia que ocurre en áreas rurales y de difícil acceso, en ocasiones a la no disponibilidad de este medicamento en hospitales rurales y a la práctica de la medicina tradicional como terapia primaria para tratar estos accidentes, hecho que se estima ocurre entre el 40-50% de los pacientes mordidos (Gutiérrez et. al., 1998; Otero, 2009).

Estos factores contribuyen a que al momento de administrar la terapia convencional, las toxinas implicadas en el desarrollo de lesiones a nivel local hayan ejercido su efecto. Adicionalmente, en trabajos experimentales se ha

demostrado que la administración del antiveneno inmediata a la inyección del veneno, no neutraliza efectos locales como la mionecrosis (Rucavado et al., 2012). Por esta razón, es fundamental encontrar tratamientos coadyuvantes a la terapia con antivenenos, que permitan reducir los efectos tóxicos locales como la mionecrosis, lo que ha estimulado el desarrollo de diferentes estudios que buscan inhibir algunas toxinas del veneno como por ejemplo las PLA₂ miotóxicas (Lindahl and Tagesson, 1997; Gutiérrez et al., 1998; Ticli et al., 2005; Da Silva et al., 2009).

Entre estos estudios se destaca la evaluación de plantas con potencial antiofídico, entre ellas, *Bixa orellana* L (Achiote), ya que el uso de sus hojas y ramas fue descrito como tratamiento del accidente ofídico en la medicina tradicional de Colombia (Otero et al., 2000a). Adicional a esto, el extracto de hojas demostró inhibición de varios de los efectos del veneno de *B. asper/B. atrox in vitro*, entre ellos el efecto hemolítico indirecto, indicando actividad sobre las fosfolipasas A₂ del veneno (Otero et al., 2000b, 2000c).

En este trabajo se pretendió determinar si el extracto etanólico de *Bixa orellana* L inhibía la mionecrosis local inducida por la fosfolipasa A₂ Lis49 del veneno de *B. atrox*, mediante la aplicación *in situ* como tratamiento y administrándolo vía oral como quimiopreventivo. Para esto se utilizaron como indicadores los niveles de Creatina-kinasa y el análisis histopatológico.

4.3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.3.1 Purificación de la toxina

El veneno fue obtenido de especímenes de *Bothrops atrox* adultos que permanecen en cautiverio en el Serpentario de la Universidad de Antioquia. El veneno fue extraído manualmente, centrifugado, liofilizado y congelado a -70°C hasta su uso. Para el aislamiento de la PLA₂ Lis49, se utilizó una muestra de 400mg de veneno disuelto en 3mL de Tris (0,05M) y Cloruro de Potasio (KCl 0,1 M) a pH 7,0. La muestra se inyectó a una columna Sephadex C-25- Carboximetilo.

Las proteínas fueron eluidas empleando un gradiente de 0.1 a 0.75 M de KCl a 1mL/min; el perfil de elución fue monitoreado a 280 nm. Se obtuvieron 6 fracciones, de las cuales se colectó la fracción seis, correspondiente a la PLA₂ de acuerdo a lo descrito por Núñez et al., (2004a). Posteriormente se dializó, se secó y se evaluó su pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida sodio-duodecil-sulfato (SDS-PAGE) al 12% en un sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), adicionalmente se realizó cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC), empleando una columna C18 (Restek) y un cromatógrafo Shimadzu. La proteína fue eluída empleando un gradiente lineal de acetonitrilo de 0 a 66% (v/v) con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). La pureza se determinó empleando como solvente A: TFA 0.1% y solvente B acetonitrilo con las siguientes condiciones de corrida: 5 min 0% solvente B; 5 a 20 min gradiente de 0 a 70 % con el solvente B y 5 min 70% de solvente B. La lectura se realizó a 215 nm.

4.3.3.2 Material vegetal y preparación del extracto de *Bixa orellana*

El material vegetal fue colectado de plantas cultivadas en un predio privado del municipio de San Luis, Antioquia. Las hojas fueron secadas en una incubadora convencional a temperatura de 37±0.2°C durante 48 horas. El material seco fue sometido a un proceso de percolación con etanol (Merck®, Alemania) al 96% en una relación 1:4 hoja: solvente durante 60 horas, este proceso se realizó con agitación continua a 4±0.2°C protegido de la luz; pasadas 60 horas, el material fue filtrado y secado en Speedvac (Vacufuge plus, Eppendorf) y almacenado a -20°C hasta su uso.

4.3.3.3 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) Swiss Webster convencionales de cinco a seis semanas de edad, hembras y machos, entre 20 y 25 gramos de peso corporal. Los animales pertenecían al Bioterio de la Sede de Investigación Universitaria, se mantuvieron con luz artificial y un fotoperiodo de 12 horas, temperatura de 22±1 °C y humedad relativa de 60±4 %. Previo a cada experimento se realizó un periodo de adaptación al medio de cinco días. Todos los

animales recibieron tratamiento analgésico con Tramadol (Laboratorio Farmacéutico Vitalis, Bogotá, Colombia), a dosis única de 31,6 mg/kg vía SC previo a la administración de la toxina. Los animales empleados y los protocolos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia (Acta Nro. 87 del 30 de Enero de 2014).

4.3.3.4 Ensayo de inhibición con la administración *in situ* del extracto

Para este experimento se utilizaron 3 grupos de 5 ratones; los grupos 1 y 2 recibieron la inyección de la toxina (20µg/50µL de SSF) en el músculo gastrocnemio derecho, el tercer grupo recibió como control la inyección intramuscular de 50µL de SSF. Treinta segundos después, el grupo 1 recibió una inyección de 50µL de SSF y los grupos 2 y 3 el extracto de hojas de *B. orellana* (200 µg/50µL de SSF) en el mismo lugar de la inyección de la toxina. Los animales fueron evaluados durante la media hora subsecuente. Tres horas después se tomó una muestra de sangre de todos los animales para determinar la actividad de la Creatina-kinasa (CK, Wiener Laboratories, Colombia), la muestra se almacenó en capilares heparinizados. Posteriormente se realizó eutanasia con CO₂ y se tomaron muestras del músculo gastrocnemio y de la piel del sitio de inyección para la evaluación histopatológica.

4.3.3.5 Ensayo de inhibición con la administración oral del extracto

Para este experimento se utilizaron tres grupos de seis ratones cada uno; los grupos uno y dos recibieron el extracto de *B. orellana* (50µg/g en 0,2mL de SSF) vía oral y el grupo tres recibió 0,2mL de SSF vía oral cada 24 horas durante 4 días. El día cuarto, 60 minutos después de la administración del tratamiento, los grupos uno y tres recibieron una inyección intramuscular de la toxina (20µg/50µL de SSF) y el grupo dos recibió inyección de 50µL de SSF en el músculo gastrocnemio derecho. Los animales fueron observados durante la primera media hora. Tres horas después se les tomó una muestra de sangre para determinar la actividad de la Creatina-kinasa (CK), la cual se almacenó en capilares heparinizados. Finalmente se realizó eutanasia con CO₂ a las 24 (n=9) y 48

horas(n=9) horas posteriores a la administración de la toxina y durante la necropsia se tomaron muestras del músculo gastrocnemio, de la piel del sitio de inyección, del corazón y de los riñones.

4.3.3.6 Análisis histopatológico

Las muestras de tejido se fijaron en formalina bufferada al 10%, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4µm de espesor (García del Moral, 1993). Todos los tejidos se tiñeron con Hematoxilina Eosina, H-E y el músculo, además, se coloreó con Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica, HAF (García del Moral, 1993). El procesamiento de las muestras y la lectura se realizó en el laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia. Para el análisis histopatológico, los cortes se evaluaron en un microscopio óptico Leica DMLB (Meyer Instruments, Houston, TX, USA) y a las lesiones observadas se les dio una valoración semi-cuantitativa (Tabla 4). Con la coloración de Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica se determinó el grado de pérdida de estriaciones y lisis celular. Para realizar una evaluación cuantitativa de la necrosis del músculo se tomaron microfotografías de los cortes con una cámara digital Leica EC3 Microscopy (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). La imágenes fueron analizadas con el Software ImageJ (Rasband, 2014), donde se delimitó y midió el área del tejido sano y del tejido necrótico y se determinó el porcentaje de afectación del tejido.

Tabla 4. Escala de medición de las variables histopatológicas

Escala	Interpretación de la lesión	Extensión
1	Sin lesión	No presencia
2	Lesión leve	Focal, 15% del tejido afectado
3	Entre leve y moderada	Focal, compromiso del 15-35% del tejido
4	Moderada	Multifocal, compromiso del 35-50% del tejido
5	Entre moderada y severa	Multifocal, compromiso del 65-85% del tejido
6	Severa	Extensa, difusa, compromiso 85-100% del tejido

4.3.3.7 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre los grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Withney. El valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron en el Software SPSS (IBM, Statistic Version 20).

4.3.4 RESULTADOS

4.3.4.1 Ensayo de inhibición *in situ*

Tres horas después de la administración de la toxina se observó que los animales que solo recibieron la toxina presentaban edema severo; mientras que los que recibieron el extracto de hojas como tratamiento presentaban edema leve del miembro inyectado. Respecto a los niveles de creatina-kinasa entre el grupo que recibió el tratamiento (grupo 2) con el grupo que no lo recibió (grupo 1), presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,009$), lo que indica que el extracto de hojas logró reducir la mionecrosis ocasionada por la toxina. En el grupo que solo recibió el extracto (grupo 3) no se observó aumento de la CK (Figura 7).

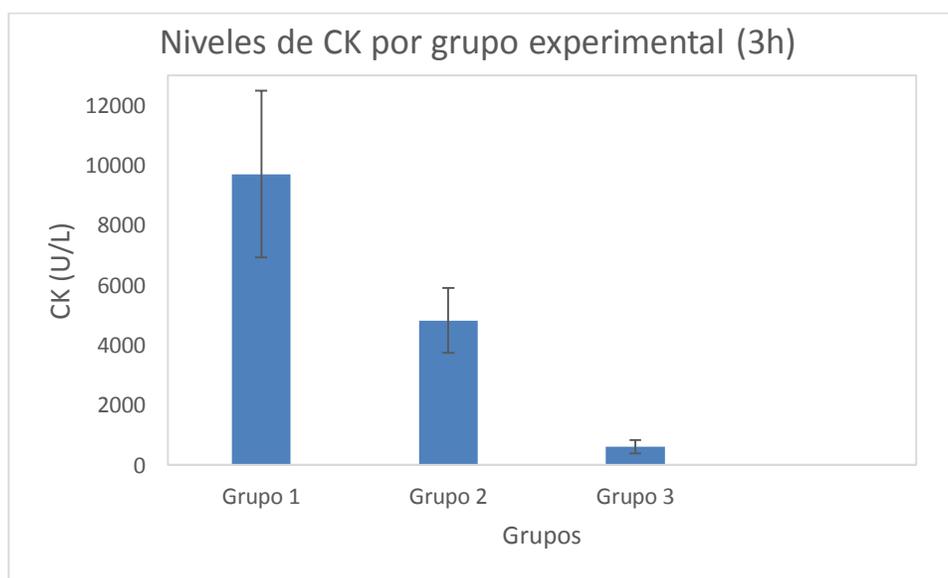


Figura 7. Niveles de la enzima Creatina-kinasa a las tres horas post-aplicación del tratamiento en el ensayo de inhibición *in situ*. Grupo 1: Control positivo; Grupo 2: Tratamiento con el extracto; Grupo 3: Control negativo, (n=15).

En el análisis histopatológico semicuantitativo, los animales que recibieron la solamente la inyección de la toxina (grupo 1) presentaron mionecrosis de moderada a severa, edema, degeneración hialina de las fibras musculares y un infiltrado leucocitario constituido principalmente por neutrófilos. En los animales que recibieron el tratamiento con el extracto de *Bixa orellana in situ* (grupo 2), se encontró que la necrosis generada por la toxina se redujo (Figura 8), diferencia que fue estadísticamente significativa respecto al grupo que recibió la toxina únicamente ($p=0.009$). Adicionalmente, en los animales que recibieron el tratamiento con el extracto (grupo 2), también disminuyó el edema ($p=0.031$); mientras que la degeneración de las fibras y la inflamación del músculo no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos ($p=0.606$ y $p=0.058$, respectivamente).

En la evaluación cualitativa con la coloración con Hematoxilina Ácida-Fosfotúngstica (HAF) se evidenció que los animales que recibieron el tratamiento con el extracto (grupo 2) presentaron menor porcentaje de pérdida de estriaciones y de lisis o necrosis de las fibras musculares, lesiones que se muestran en la y Figura 9. A partir del procesamiento de las fotografías de los cortes de músculo en el Software ImageJ, se encontró que la necrosis ocasionada por la toxina afectó entre el 42,46 y 46,40% del músculo inyectado, mientras que en los animales que recibieron el tratamiento con el extracto de hojas la necrosis solo fue del 16,19 al 28,00% del músculo.

En la piel del sitio de inyección se observó paniculitis exudativa y edema, de estas lesiones solo el edema se redujo de forma leve al administrar el extracto *in situ* en el grupo 2 ($p=0.032$). Adicionalmente, se observó que en los animales que solo recibieron la inyección del extracto, se desarrolló inflamación y edema leve.

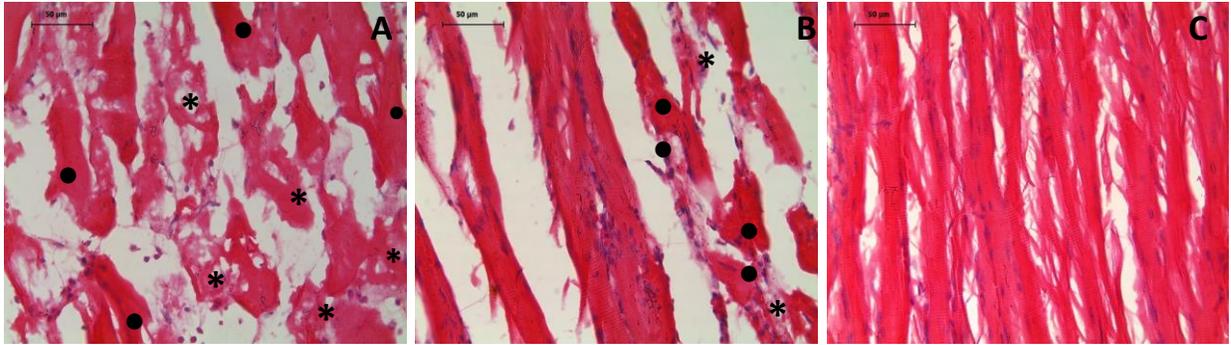


Figura 8. Fragmentos del músculo gastrocnemio a las 3 horas post-aplicación del tratamiento *in situ*: A. Toxina-Solución salina (grupo 1), B. Toxina-Extracto (grupo 2), C. Extracto -Solución salina (grupo 3). El * muestra la contracción y necrosis de la fibra muscular y el ● indica la degeneración hialina de las fibras. Tinción H-E, 400X.

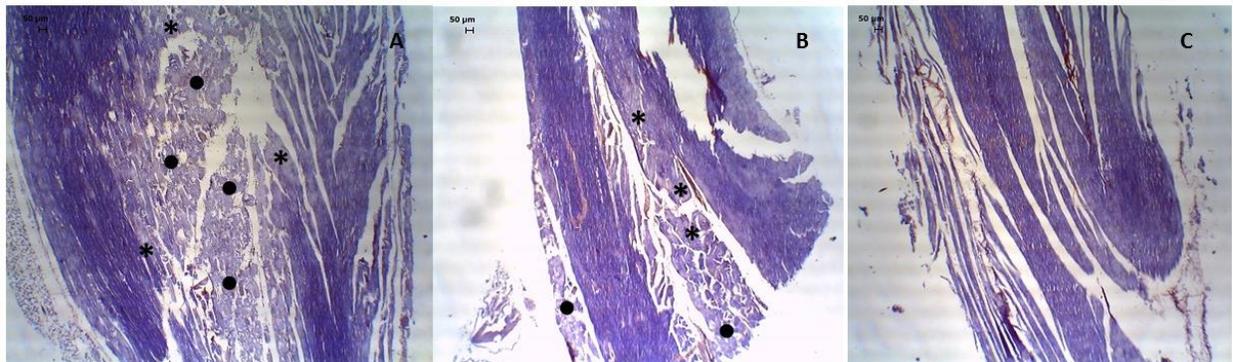


Figura 9. Fragmentos del músculo gastrocnemio a las 3 horas post-aplicación del tratamiento *in situ*: A. Toxina-Solución salina (grupo 1), B. Toxina-Extracto de hojas (grupo 2), C. Extracto de hojas-Solución salina (grupo 3). El * resalta el área donde hay pérdida de estriaciones de las fibras y el ● indica las áreas de lisis y necrosis de las fibras. Tinción HAF, 400X.

4.3.4.2 Ensayo de inhibición oral

Durante el tiempo que se administró el extracto vía oral, no se observaron cambios en el comportamiento ni en el estado clínico de los animales. En los grupos que recibieron la inyección de la miotoxina, se observó edema leve en el miembro afectado a las 24 horas, pero no a las 48 horas, hecho que fue independiente de que hubiesen recibido el tratamiento. Los niveles de Creatina-kinasa (CK) entre el grupo que recibió el tratamiento con *B. orellana* y el grupo que solo recibió la miotoxina, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,522$), lo cual indica que el extracto de hojas vía oral no logró reducir la mionecrosis

ocasionada por esta fosfolipasa. En el grupo que solo recibió el extracto no se observó aumento de la CK (Figura 10).

En la valoración semicuantitativa del músculo a las 24 horas (n=9), se observó mionecrosis tóxica entre moderada y severa en todos los animales que recibieron la miotoxina, independiente de que hubiesen recibido el tratamiento (p=1,000). En las variables edema (p=0,176) e inflamación (p=0,932) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a las 24 y 48 horas, mientras que en la variable degeneración hialina si se evidenciaron diferencias leves (p=0,043), con un menor grado de lesión en el grupo que recibió el tratamiento con el extracto. En los animales que se sacrificaron a las 48 horas (n=9), se observó reparación del músculo en fase temprana, donde predominaron macrófagos y neutrófilos fagocitando las fibras necróticas, así como la proliferación de células satélite miogénicas, fibroblastos hipertróficos y aumento en el número de mitosis (Figura 11 y Figura 12). Estos hallazgos no se relacionaron con la administración del extracto.

En la piel se observó dermatitis exudativa leve, independiente de que hubiesen recibido el extracto como tratamiento. En el corazón y en el riñón no se evidenciaron lesiones significativas ni diferencias entre grupos.

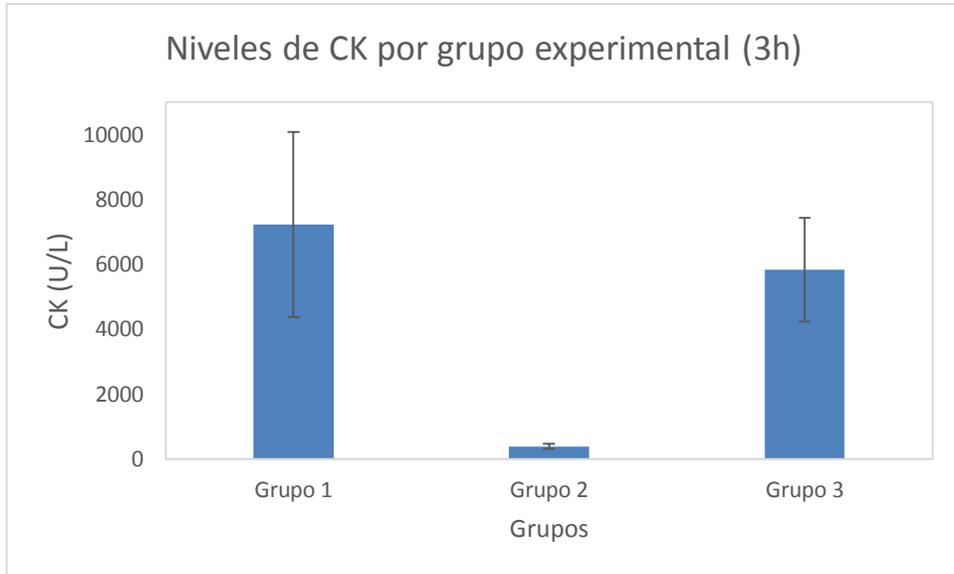


Figura 10. Niveles de la enzima Creatina-kinasa a las tres horas post-aplicación del tratamiento en el ensayo de inhibición oral. Grupo 1: Tratamiento; Grupo 2: Control negativo; Grupo 3: Control positivo, (n=18).

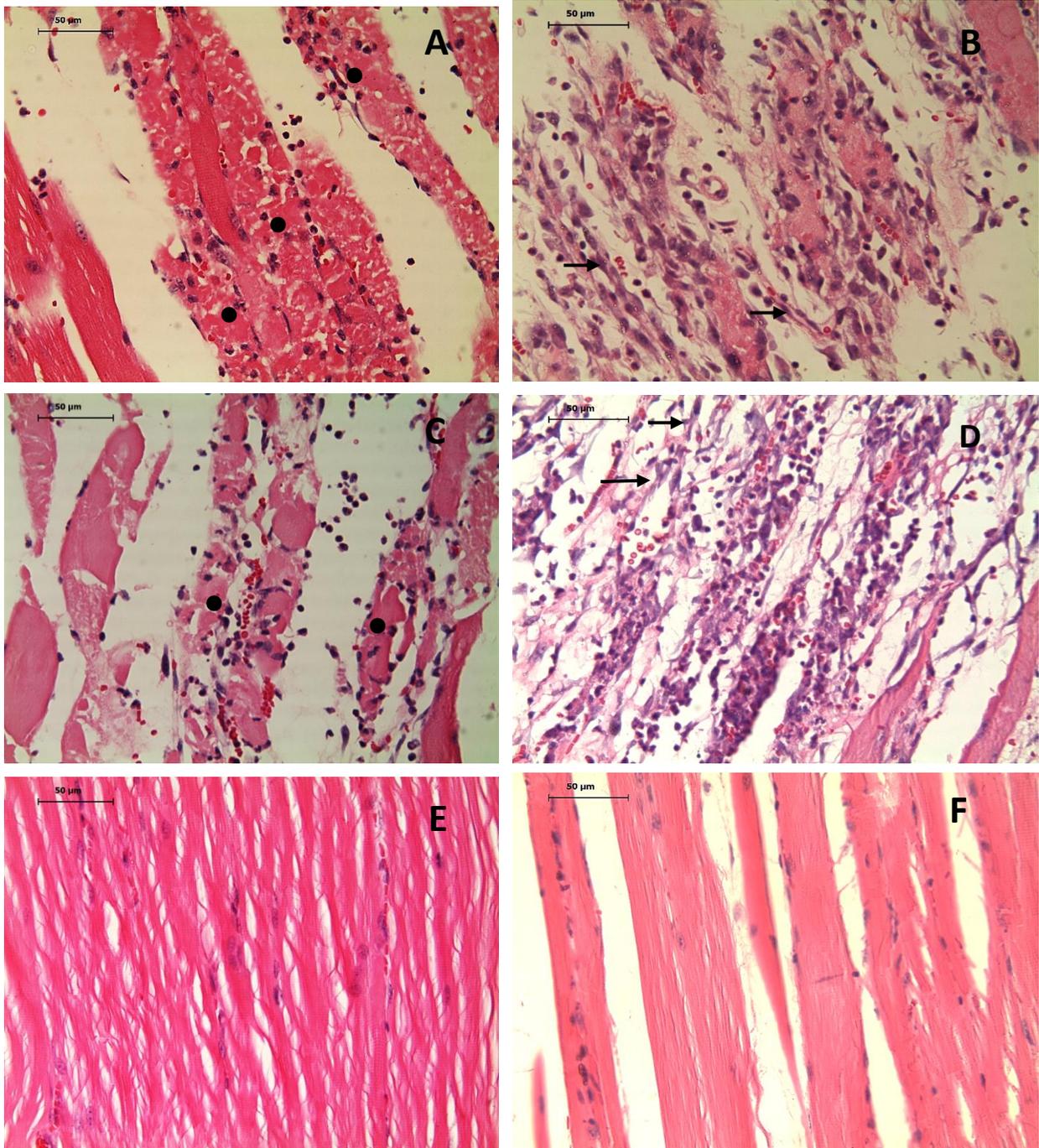


Figura 11. Fragmentos del músculo gastrocnemio del ensayo de inhibición oral, Figuras A, C y E 24 horas; B, D y F a las 48 horas. Nótese la necrosis y la fagocitosis por neutrófilos a las 24 horas (●), mientras que a las 48 horas predominan los macrófagos que fagocitan los restos de fibras necróticas y la proliferación de células satélite miogénicas y de fibroblastos (flechas). A y B: Tratamiento con el extracto (grupo 1); C y D: Control positivo (grupo 3); E y F: Control negativo (grupo 2). Tinción H-E, 400X.

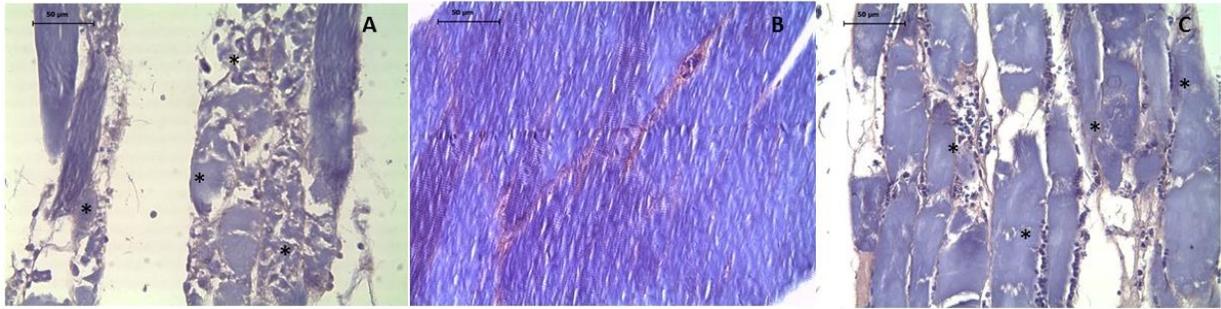


Figura 12. Fragmentos del músculo gastrocnemio a las 24 horas del ensayo de inhibición oral. El * señala las áreas de necrosis de las fibras, nótese que no hubo diferencias entre las figuras A y C. A: Tratamiento con el extracto (grupo 1), B: Control negativo (grupo 2), C: Control positivo (grupo 3). Tinción HAF, 400X.

4.3.5 DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que el extracto de hojas de *Bixa orellana* logró disminuir la mionecrosis ocasionada por la PLA₂ Lis 49 del veneno de *B. atrox* al aplicarlo vía intramuscular segundos después de la inyección de la miotoxina, sin embargo, al administrarse vía oral como pre-tratamiento no se observó inhibición lo que indica que posiblemente los compuestos con potencial terapéutico deban administrarse por vía intramuscular o local, donde se garantice la biodisponibilidad de forma rápida en el sitio de la mordedura (Gutiérrez y Ownby, 2003).

Previamente se han reportado terpenoides, tocotrienoles y flavonoides en el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana*, compuestos que experimentalmente han presentado propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Shilpi et al., 2006; Viuda-Martos et al., 2012; Stohs, 2013).

En estudios experimentales los compuestos fenólicos han inhibido las fosfolipasas A₂ del veneno de serpientes (Lindahl and Tagesson, 1997; Carvalho et al., 2013). Entre ellos, el ácido rosmarínico y el α -Tocoferol, cuyo mecanismo de inhibición propuesto es por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del anillo aromático del compuesto con los aminoácidos de la toxina, lo que genera interferencia en la capacidad de ligar calcio por parte de esta. Otro mecanismo

propuesto es la interacción con puentes hidrofóbicos mediados por anillos aromáticos entre el compuesto y la toxina (Chandra et al., 2002; Ticli et al., 2005; Da Silva et al., 2009; Pereañez et al., 2011). También se ha propuesto que los taninos, precipitan las proteínas de los venenos mediante la quelación de iones metálicos divalentes como Calcio y Zinc, necesarios para la actividad de algunas de estas toxinas, como es el caso de las PLA₂ (Zhang et al., 2013; Mourão et al., 2014).

Los resultados sobre la aplicación *in situ* del extracto de *B. orellana* en este trabajo, soportan lo planteado en estudios experimentales previos (Chandra et al., 2002; Ticli et al., 2005; Da Silva et al., 2009; Pereañez et al., 2011), donde se plantea que el efecto de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de plantas es inhibir la fosfolipasa al impedir que ejerza su actividad, pero no actúan sobre los efectos que esta produce en el tejido. Adicionalmente, es importante destacar que en los modelos de evaluación de extractos de plantas, generalmente se incluyen experimentos *in vitro*, es decir, donde se pre incubaba el extracto previo a su inoculación en el animal, sin embargo, este método se ha re-evaluado ya que sobreestima la capacidad inhibitoria del extracto (Mourão et al., 2014). Por esto, evaluar estos compuestos en condiciones similares a su uso convencional, muestra las propiedades inhibitorias reales de estos, tal como se evidencia en este estudio.

El extracto de *B. orellana* logró inhibir parcialmente la necrosis y el edema ocasionados por la miotoxina, sin embargo, no inhibió la inflamación ni la degeneración hialina ocasionada por esta. En el estudio realizado por Mora et al., (2008), se demuestra que el edema ocasionado por la PLA₂ Lis49 esta mediado en gran parte por la contracción de los vasos linfáticos y la reducción en su lumen impidiendo el drenaje de fluidos, ya que se encontró que la miotoxina es citotóxica para las células de músculo liso en cultivo y se presume que afecta las células del músculo liso presentes en los vasos. Adicionalmente, se ha descrito que la miotoxina produce incremento en la prostaglandina E₂ y en la expresión de COX-2, lo que implica que el daño en la membrana plasmática de la célula muscular no

es el único mecanismo por el cual se liberan mediadores inflamatorios producto de la actividad de dicha toxina (Teixeira et al., 2009; Moreira et al., 2013). Estos mecanismos descritos, soportan la idea de que la vía por la que se desarrolla la inflamación es diferente a la vía por la cual se produce la lesión en la célula muscular (Kanashiro et al., 2002).

Las lesiones observadas en el músculo a las 3 horas post-inyección, están relacionadas con lo descrito previamente por Gutiérrez et al., (2003) y Lomonte et al., (2003) para las miotoxinas de *B. asper*, donde se evidencia mionecrosis local extensa, edema e infiltrado leucocitario constituido principalmente por polimorfonucleares. Este infiltrado se extendió hasta el panículo y la dermis en el sitio de inyección, hecho que fue descrito por Teixeira et al., (2009). A las 24 y 48 horas post-inyección, se observó predominio del infiltrado por macrófagos, proliferación de células satélite miogénicas, fibroblastos y mitosis, lesiones que se han asociado a la inyección de las fosfolipasas A₂ miotóxicas. Estas toxinas no afectan las células satélites, por lo cual se soporta el hecho de que el daño en la micro-vasculatura local generado por las metaloproteasas o el veneno completo es el responsable de que la reparación del músculo disminuya (Gutiérrez et al., 2003-2009; Teixeira et al., 2009).

Bixa orellana es un arbusto ornamental nativo de Centro y Suramérica, ampliamente utilizado por la medicina tradicional para tratar diversas dolencias, entre ellas las mordeduras de serpientes (Silva et al., 1998; Otero et al., 2000a; Ciro et al., 2012; Ezuruike y Prieto, 2014). En estudios previos con el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* se evidenció inhibición *in vitro* (es decir incubando el extracto con el veneno previo a su inyección) de los efectos letales del veneno completo de *Bothrops asper/atrox* de forma parcial (45-80%), logrando un 10-30% de supervivencia en los animales. Adicionalmente, inhibió el efecto hemorrágico (100% *in vitro* y 19% *in vivo*), el edema (77% *in vitro* y <28% *in vivo*) y también en un 100% la actividad hemolítica indirecta, que se relaciona con actividad anti-fosfolipasa. (Otero et al., 2000b-2000c; Núñez et al., 2004b). La

actividad antiofídica de los extractos de plantas se ha descrito ampliamente (Flórez, 1951; Joly et al., 1987; Martz, 1992; Houghton y Osibogun, 1993; Otero et al., 2000a) y esta actividad se ha atribuido a compuestos como flavonoides, cumarinas y otros compuestos polifenólicos (Lindahl and Tagesson, 1997; Pereáñez et al., 2010). Estos compuestos tienen actividad antioxidante que detienen o disminuyen el daño oxidativo (Pereañez et al., 2010). Respecto a la actividad antioxidante, se cree que está relacionada con el secuestro de radicales libres, donación de un H⁺, quelación de iones metálicos, o incluso que tengan el rol de sustrato para superóxido o radicales hidroxilo (Viuda-Martos et al., 2012).

Al extracto de hojas de *Bixa orellana* se le atribuye actividad anti-inflamatoria, ampliamente descrita en la medicina tradicional (Silva et al., 1998; Ezuruike y Prieto, 2014) y en estudios experimentales en ratas, donde el extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* inhibió el edema y la inflamación ocasionada por Bradicinina, Serotonina, Histamina y Carragenina (Yong et al, 2011-2013a-2013b). No obstante, en este estudio no se observó actividad antiinflamatoria del extracto etanólico, posiblemente porque los compuestos presentes en los extractos varían de acuerdo al tipo de extracción, el solvente utilizado, el tiempo que lleva el material vegetal cosechado, la localización geográfica y la variación climática bajo las cuales creció la planta (Stohs, 2013). En un estudio realizado con el extracto de hojas de *B. orellana*, se encontró que la mayor cantidad de compuestos se obtuvieron en extractos de cloroformo y metanol y la menor con extractos acuosos (Radhika et al., 2010).

Análisis fitoquímicos del extracto acuoso han revelado la presencia de 2-butanamina, ácidos acético y benzoico, ácido pentanoico, fenol y pantolactona, siendo el ácido acético el mayor constituyente del extracto acuoso, al cual se le atribuye actividad anti-inflamatoria; como supresión de citoquinas y adhesión leucocitaria. (Yong et al., 2013b). Sin embargo, en el extracto metanólico y etanólico de de hojas de *Bixa orellana* predominan flavonoides, esteroides,

terpenoides, fenoles, taninos, saponinas, alcaloides, glicósidos (Radhika et al., 2010; Viuda-Martos et al., 2012)

Si bien en el estudio realizado por Núñez et al., 2004b se describió que el extracto de hojas de *Bixa orellana* presentó actividad anti-edematogénica del veneno de *B. asper/atrox* a dosis de 12,5µg, también se encontró que este extracto inducía edema a dosis mayores a 200µg, resultados que son compatibles con los nuestros, ya que el extracto de hojas produjo edema e inflamación leve en los animales del control. No obstante, se debe resaltar que el modelo de edema empleado en el estudio de Núñez et al., (2004b), se utiliza veneno crudo y la vía de inyección es subcutánea, mientras que este estudio la inyección es intramuscular y se utilizó una dosis alta del extracto debido a que se requería neutralizar una dosis alta de la toxina.

En el accidente ofídico las lesiones locales como hemorragia, mionecrosis, dermonecrosis y edema constituyen uno de los principales efectos del veneno de vipéridos como *Bothrops atrox*, que además suelen generar complicaciones como infecciones bacterianas secundarias y síndrome compartimental. (Lomonte y Rangel, 2012; Gutiérrez et al., 2009). El riesgo de desarrollar estas secuelas, es mayor cuando el tratamiento con el antiveneno se administra después de dos horas de la mordedura, especialmente cuando hay mionecrosis, edema y hemorragia extensa (Otero, 2009). El difícil acceso en las áreas rurales de los países tropicales limita la administración temprana del antiveneno, lo que indica que se requieren encontrar coadyuvantes que ayuden a neutralizar estos efectos locales en los minutos posteriores a la mordedura (Gutiérrez et al., 1998). Aunque el tratamiento con antiveneno es eficaz para reducir efectos como la hemorragia y las alteraciones de la coagulación; la mionecrosis es un efecto de difícil neutralización, aun si se ha administrado previamente el antiveneno (Rucavado et al., 2012). En este estudio se encontró que el extracto de hojas de *Bixa orellana* puede convertirse en un adyuvante fito-terapéutico local con potencial para disminuir la mionecrosis severa que ocurre en estos envenenamientos. Se

sugieren estudios futuros que permitan caracterizar los compuestos bioactivos de este extracto y evaluar a profundidad esta alternativa, del mismo modo evaluar el papel en el proceso reparativo de la lesión, teniendo en cuenta que en análisis preliminares se ha encontrado un bajo potencial tóxico en este extracto y su uso medicinal externo está aprobado por la Comisión Revisora de Productos Farmacéuticos del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) en Colombia (Silva et al., 1998; Fonnegra y Jiménez, 2007; Stohs, 2013).

4.3.6 AGRADECIMIENTOS.

A los compañeros del Serpentario y del Programa de Ofidismo/Escorpionismo. Al laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias. Este trabajo se realizó gracias a la financiación obtenida por el Programa de Jóvenes Investigadores COLCIENCIAS 2013 y el Programa de Sostenibilidad Universidad de Antioquia 2014-2015.

4.3.7 REFERENCIAS

Angulo Y., Lomonte B. 2009: Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54:949-957.

Carvalho BM, Santos JD, Xavier BM, Almeida JR, Resende LM, Martins W, Marcussi S, Marangoni S, Stábili RG, Calderon LA, Soares AM, Da Silva SL, Marchi-Salvador DP. 2013: Snake venom PLA_{2s} inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013:153045. doi: [10.1155/2013/153045](https://doi.org/10.1155/2013/153045).

Chandra V., Jasti J., Kaur P., Betzel Ch., Srinivasan A. y Singh T.P. 2002: First Structural Evidence of a Specific Inhibition of Phospholipase A₂ by α-Tocopherol (Vitamin E) and its Implications in Inflammation: Crystal Structure of the Complex Formed Between Phospholipase A₂ and α-Tocopherol at 1.8 Å. *Journal of Molecular Biology*, 320: 215-222.

Ciro G., Quintana JC., Alarcón JC., Zapata JE. 2012: Ethanollic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. *Interciencia*, 37 (7):547-551.

Da Silva SL., Calgarotto AK., Maso V., Damico DC., Baldasso P., Veber CL., Villar JA., Oliveira AR., Comar MJR., Oliveira KM., Marangoni S. 2009: Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44:312-321.

Ezuruike U.F. y Prieto J.M. 2014: The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *Journal of Ethnopharmacology*, 155:857–924.

Flórez, L. 1951: Medicina, magia y animismo en Segovia de Antioquia. *Revista de Folklore Instituto Etnológico Nacional* 6:185-195.

Fonnegra Gómez R.D.J y Jiménez Ramírez S.L. 2007: Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2ª edición. Editorial Universidad de Antioquia. 368p.

García del Moral, R. 1993: Manual de Laboratorio de Anatomía Patológica. S.A. McGraw-Hill/Interamericana. 450p.

Gutiérrez JM., León G., Rojas G., Lomonte B., Rucavado A., Chaves F. 1998: Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 36: 1529-1538.

- Gutiérrez JM. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. 2002: Revista de Biología Tropical, 50(2): 377-394.
- Gutiérrez JM. and Ownby C. 2003: Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42: 915-931.
- Gutiérrez JM., 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.
- Houghton, P.J., Osibogun, I.M. 1993: Flowering plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, 39: 1-29.
- Joly, L.G., Guerra, S., Séptimo, R., Solís, P.N., Correa, M., Gupta, M., Levy, S., Sandberg, F. 1987: Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in Western Panamá. Part I. *Journal of Ethnopharmacology*, 20: 145-171.
- Kanashiro M., Escocard R.C., Petretski J., Prates M., Alves E., Machado O., Da Silva W., Kipniz T. 2002: Biochemical and Biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, 64:1179-1186.
- Lindahl M., Tagesson C. 1997: Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. *Inflammation*, 21 (3): 347-356.

- Lomonte B., Angulo Y., Calderón L. 2003: An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42: 885-901.
- Lomonte B., Rangel J. 2012: Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, 60: 520-530.
- Martz, W. 1992. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, 30: 1131-1142.
- Mora J., Mora R., Lomonte B., Gutiérrez J.M. 2008: Effects of *Bothrops asper* Snake Venom on Lymphatic Vessels: Insights into a Hidden Aspect of Envenomation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(10): e318. doi:10.1371/journal.pntd.0000318
- Moreira V., Maggio de Castro Souto PC., Ramirez MA., Lomonte B., Gutiérrez JM., Curi R., Teixeira C. 2013: A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A₂ homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 708: 68-79.
- Mourão de Moura V., Serra Bezerra A.N., Veras Mourão R.H., Varjão Lameiras J.L., Almeida Raposo J.D., Luckwu de Sousa R., Boechat A.L., Bezerra de Oliveira R., Menezes Chalkidis H., 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.
- Núñez V., Arce V., Gutiérrez JM., Lomonte B. 2004a: Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*, 44: 91-101.

- Núñez V., Otero R., Barona J, Saldarriaga M., Osorio R., Fonnegra R., Jiménez S., Díaz A., Quintana J. 2004b: Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37: 969-977.
- Núñez V., Cid P., Sanz L., De la Torre P., Angulo Y., Lomonte B., Gutiérrez J.M., Calvette J. 2009: Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon Region of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. Journal of Proteomics, 73: 57-78.
- Otero R., Núñez V., Jiménez S., Fonnegra R., Osorio R., Garcia M., Díaz A. 2000a: Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. Journal of Ethnopharmacology, 71: 493-504.
- Otero R., Núñez V., Jiménez S., Fonnegra R., Osorio R., Garcia M., Díaz A. 2000b: 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: 505-511.
- Otero R., Núñez V., Barona J., Fonnegra R., Jiménez S., Osorio R., Saldarriaga M., Díaz A. 2000c: Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III. Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology, 73; 233-241.
- Otero R., Gutiérrez J., Mesa MB., Duque E., Rodríguez O., Arango J., Gómez F., Toro A., Cano F., Rodríguez L., Caro E., Martínez J., Cornejo W., Gómez LM., Uribe F., Cárdenas S., Núñez V., Díaz A. 2002: Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. Toxicon, 40: 1107-1114.

- Otero-Patiño, R. 2009: Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 54: 998-1011.
- Pereañez A., Núñez V., Patiño AC., Londoño M., Quintana JC. 2011: Inhibitory effects of plant phenolyc compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A₂. *Vitae*, 18 (3): 295-304.
- Pereañez A., Lobo-Echeverry T., Rojano B., Vargas L., Fernández M., Gaviria C.A., Núñez V. 2010: Correlation of the inhibitory activity of phospholipase A₂ snake venom and the antioxidant activity of Colombian plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6): 910-916.
- Rasband, W.S. 2014: ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
- Rucavado A., Escalante T., Shannon J.D., Ayala-Castro C.N., Villalta M., Gutiérrez J.M. and Fox J.W. 2012: Efficacy of IgG and F(ab)² Antivenoms to Neutralize Snake Venom-induced Local Tissue Damage as Assessed by the Proteomic Analysis of Wound Exudate. *Journal of Proteome Research*, 11: 292–305.
- Shilpi JA., Taufiq-Ur-Rahman MD., Uddin SJ., Shahanur Alam MD., Sadhu SK., Seidel V. 2006: Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 264-271.
- Silva H, Alvarado R, Hidalgo J, Cerruti T, Dávila W, Mestanza M, et al,. 1998: Instituto de Medicina Tradicional (IMET)-Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS). *Bixa orellana* L. Monografías de Plantas Medicinales N° 02. Iquitos: IMET-IPSS: 12-20.

Sivigila, Boletín Epidemiológico semana 53, 2014. Fecha de consulta: 22 de enero de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2053.pdf>

Stohs S.J. 2013: Safety and Efficacy of *Bixa orellana* (Achiote, Annatto) Leaf Extracts. *Phytotherapy Research*. doi: 10.1002/ptr.5088

Ticli F.K., Hage LIS., Cambraia RS., Pereira PS., Magro AJ., Fontes MRM., Stábeli RG., Giglio JR., Franca SC., Soares AM., Sampaio SV. 2005: Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, 46 (3): 318-327.

Teixeira C., Cury Y., Moreira V., Picolo G., Chaves F. 2009: Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, 54: 67–76

Viuda-Martos M., Ciro-Gómez G., Ruiz-Navajas Y., Zapata-Montoya JE., Sendra E., Pérez-Álvarez JA., Fernández-López J. 2012: *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and sedes. *Journal of Food Safety*, 32: 399-406.

World Health Organization. Listado de enfermedades desatendidas. 2009: Fecha de consulta: 26 de junio de 2012. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en

Walteros D. y Paredes A. 2014: Protocolo de vigilancia en salud pública: Accidente Ofídico. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Consultado 28 de Enero de 2015

<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Accidente%20Ofidico.pdf>

Yong YK, Zakaria ZA, Kadir AA, Somchit MN, Ee Cheng Lian G, Ahmad Z. 2013a: Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. BMC Complementary Alternative Medicine, 13 (32): 1-7.

Yong YK., Kadir A.A., Sukardi S., Roslida A.H., Somchit M.N., Ahmad Z. 2011: *Bixa orellana* leaves extract inhibits Bradikynin-induced inflammation through suppression of Nitric Oxide Production. Medical Principles and Practice, 20: 142-146.

Yong, Y. K., Sulaiman, N., Hakim, M. N., Lian, G. E. C., Zakaria, Z. A., Othman, F., & Ahmad, Z. 2013b: Suppressions of Serotonin-Induced Increased Vascular Permeability and Leukocyte Infiltration by *Bixa orellana* Leaf Extract. BioMed Research International, 2013: 1-7.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/463145>.

Zhang Y., Zhong L., Zhou B., Chen J.Y., Li CM. 2013: Interaction of characteristic structural elements of persimmon tannin with Chinese cobra PLA₂. Toxicon, 74: 34–43.

5 CONCLUSIONES GENERALES

A partir de este trabajo se encontró que el extracto de hojas de *Bixa orellana* reduce la mionecrosis ocasionada por la PLA₂ Lis49 del veneno de *Bothrops atrox* al aplicarse *in situ* segundos después de la inyección de esta toxina. Sin embargo, al administrar el mismo extracto vía oral como pre-tratamiento, previo a la administración de la toxina, no inhibió las lesiones inducidas por esta, lo que indica que no hubo efecto quimiopreventivo del extracto. Del mismo modo, la fracción “Sm 13-26” que en un estudio previo redujo los efectos de esta toxina al administrarse *in situ*, no presentó actividad inhibitoria al administrarse vía oral. Estos resultados indican que las terapias adyuvantes con los extractos de *Bixa orellana* y *Swietenia macrophylla*, que buscan neutralizar los efectos locales de los venenos deben ser de aplicación local en el sitio de la mordedura, bien sea tópico o inyectable, debido a que la actividad de los compuestos de estos extractos actúan directamente sobre la toxina impidiendo que ejerza su actividad, no por un mecanismo indirecto en el organismo.

Adicionalmente, se logró establecer la toxicidad aguda oral en ratones de la fracción “Sm 13-26” del extracto de *Swietenia macrophylla*, lo cual contribuye a la información de la seguridad de esta planta, ya que los estudios con el extracto de sus hojas son escasos, pese a que sus compuestos representan un potencial farmacológico importante.

6 RECOMENDACIONES

Se considera importante la caracterización fitoquímica precisa del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana*, debido al potencial farmacológico que representa en la terapia del accidente ofídico. Del mismo modo, se recomienda realizar otros estudios que permitan profundizar en las propiedades de este extracto frente a otros componentes del veneno con acción local, como las metaloproteasas, con la finalidad de llegar a utilizarse como un fito-terapéutico local adyuvante de la terapia con antivenenos.

Se sugieren estudios para establecer exactamente la biodisponibilidad *in situ* de los metabolitos activos de este extracto, con el fin de generar estrategias que propendan en mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos y así ampliar su porcentaje de neutralización.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Angulo Y., Lomonte B. 2009: Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54: 949-957.
- Balijepalli, M. K., Suppaiah, V., Chin, A., Buru, A. S., Sagineedu, S. R., and Pichika, M. R. 2015: Acute oral toxicity studies of *Swietenia macrophylla* seeds in Sprague Dawley rats. *Pharmacognosy Research*, 7: 38–44. doi:10.4103/0974-8490.147197.
- Brown N., Jennings S., Clements T. 2003: The ecology, silviculture and biogeography of mahogany (*Swietenia macrophylla*): a review of the evidence. *Perspectives on Plant Ecology, Evolution, and Systematics*, 6: 37–49.
- Campbell, J.A. y Lamar, W.W. 2004: The venomous reptiles of the western hemisphere. Ithaca (NY): Cornell University Press.
- Carvalho BM, Santos JD, Xavier BM, Almeida JR, Resende LM, Martins W, Marcussi S, Marangoni S, Stábeli RG, Calderon LA, Soares AM, Da Silva SL, Marchi-Salvador DP. 2013: Snake venom PLA_{2s} inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013:153045. doi: 10.1155/2013/153045.
- Chaves F., Leoã G., Alvarado VH., Gutiérrez JM. 1998: Pharmacological modulation of edema induced by lys-49 and asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, 36: 1861-1869.
- Cheng Y.B., Chien Y.T., Lee J.C., Tseng C.K., Wang H.C., Lo I.W., Wu Y.H., Wang S.Y., Wu Y.C. and Chang F.R. 2014: Limonoids from the Seeds of

Swietenia macrophylla with Inhibitory Activity against Dengue Virus 2. Journal of Natural Products, 77: 2367-2374.

Chiste RC., Yamashita F., Gozzo FC., Mercadante AZ. 2011: Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. Journal of Chromatography A, 1218: 57-63.

Ciro G., Quintana JC., Alarcón JC., Zapata JE. 2012: Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. Interciencia, 37: 547-551.

Da Silva SL., Calgarotto AK., Maso V., Damico DC., Baldasso P., Veber CL., Villar JA., Oliveira AR., Comar MJR., Oliveira KM., Marangoni S. 2009: Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. European Journal of Medicinal Chemistry, 44: 312-321.

De Roodt AR., Lago NR., Stock RP. 2012: Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental Envenomation. Toxicon, 59: 356-364.

El Zalabani, S.M., El-Askary, H.I., Mousa, O.M., Issa, M.Y., Zaitoun, A.A., Abdel-Sattar, E. 2012: Acaricidal activity of *Swietenia mahogani* and *Swietenia macrophylla* ethanolic extracts against *Varroa destructor* in honeybee colonies. Experimental Parasitology, 130: 166–170.

Falah S., Suzuki T., Katayama T. 2008: Chemical constituents from *Swietenia macrophylla* and their antioxidant activity. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2007-2012.

- Flórez, L. 1951: Medicina, magia y animismo en Segovia de Antioquia. Revista de Folklore Instituto Etnológico Nacional 6:185-195.
- Fonnegra Gómez R.D.J y Jiménez Ramírez S.L. 2007: Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2ª edición. Editorial Universidad de Antioquia. 368.
- Fung S.Y., Tan N.H., Liew S.H., Sim S.M. and Aguiyi J.C. 2009: The protective effects of *Mucuna pruriens* seed extract against histopathological changes induced by Malayan cobra (*Naja sputatrix*) venom in rats. Tropical Biomedicine 26: 80–84.
- García del Moral, R. 1993: Manual de Laboratorio de Anatomía Patológica. S.A. McGraw-Hill/Interamericana. 450p.
- Gallacci M., Cavalcante WLG. 2010: Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. Toxicon, 55: 1-11.
- Gutiérrez JM., Lomonte B., Chaves F., Moreno E., Cerdas L. 1986: Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. Comparative Biochemistry and Physiology, 84C: 159-164.
- Gutiérrez JM., León G., Rojas G., Lomonte B., Rucavado A., Chaves F. 1998: Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon, 36: 1529-1538.
- Gutiérrez JM. 2002: Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. Revista de Biología Tropical, 50: 377-394.

- Gutiérrez JM. y Ownby C. 2003: Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42: 915-931.
- Gutiérrez JM., 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.
- Houghton, P.J., Osibogun, I.M. 1993: Flowering plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, 39: 1-29.
- Jacoby-Alner TE., Stephens N., Davern KM., Balmer L., Browne SGA., Swindells K. 2011: Histopathological analysis and *in situ* localization of Australian tiger snake venom in two clinically envenomed domestic animals. *Toxicon*, 58: 304-314.
- Joly, L.G., Guerra, S., Séptimo, R., Solís, P.N., Correa, M., Gupta, M., Levy, S., Sandberg, F. 1987: Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymí Indians in Western Panamá. Part I. *Journal of Ethnopharmacology*, 20: 145-171.
- Kanashiro M., Escocard RC, Petretski J., Prates M., Alves E., Machado O., Da Silva W., Kipniz T. 2002: Biochemical and Biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1179-1186.
- Lindahl M., Tagesson C. 1997: Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. *Inflammation*, 21: 347-356.

- Lomonte B., Angulo Y., Calderón L. 2003: An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42: 885-901.
- Lomonte B., Rangel J. 2012: Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, 60: 520-530.
- Maiti A., Dewanjee S., Kundu M., Mandal SC. 2007a: Protective effect of methanol extract of *Swietenia macrophylla* seeds on oxidative states associated with *streptozotocin* induced diabetic rats. *Natural Product Sciences*, 13: 295-299.
- Maiti A., Dewanjee S., Mandal SC. 2007b: *In vivo* evaluation of antidiarrhoeal activity of the seeds of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6: 711-716.
- Maiti A., Dewanjee S., Subhash CM., Annadurai S. 2007c: Exploration of antimicrobial potential of methanol and water extract of seeds of *Swietenia macrophylla* (Family: Meliaceae). *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 6: 99-102.
- Mandal S., Bhattacharyya D. 2007: Ability of a small, basic protein isolated from Russell's viper venom (*Daboia russelli russelli*) to induce renal tubular necrosis in mice. *Toxicon*, 50: 236-250.
- Martz, W. 1992. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, 30: 1131-1142.
- Maxie M.G., Jubb K.V.F., Kennedy P.C., and Palmer N. 2007: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Edinburgh: Elsevier Saunders.

- Moghadamtousi, S.Z.; Goh, B.H.; Chan, C.K.; Shabab, T.; Kadir, H.A. 2013: Biological activities and phytochemicals of *Swietenia macrophylla* King. *Molecules*, 18: 10465–10483.
- Mora J., Mora R., Lomonte B., Gutiérrez JM. 2008: Effects of *Bothrops asper* Snake Venom on Lymphatic Vessels: Insights into a Hidden Aspect of Envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2: e318. doi:10.1371/journal.pntd.0000318
- Moreira V., Maggio de Castro Souto PC., Ramirez MA., Lomonte B., Gutiérrez JM., Curi R., Teixeira C. 2013: A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A₂ homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 708: 68-79.
- Mootoo B.S., Ali A., Motilal R., Pingal R., Ramlal A., Khan A., Reynolds W.F. and McLean S. 1999: Limonoids from *Swietenia macrophylla* and *S. Aubrevilleana*. *Journal of Natural Products*, 62: 1514-1517.
- Mourão de Moura V., Serra Bezerra A.N., Veras Mourão R.H., Varjão Lameiras J.L., Almeida Raposo J.D., Luckwu de Sousa R., Boechat A.L., Bezerra de Oliveira R., Menezes Chalkidis H., 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.
- Naveen Y.P., Divya Rupini G., Ahmed F., Urooj A. 2014: Pharmacological effects and active phytoconstituents of *Swietenia mahagoni*: a review. *Journal of Integrative Medicine*, 12: 86-93.

- Núñez V., Arce V., Gutiérrez JM., Lomonte B. 2004a: Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*, 44: 91-101.
- Núñez V., Otero R., Barona J, Saldarriaga M., Osorio R., Fonnegra R., Jiménez S., Díaz A., Quintana J. 2004b: Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 969-977.
- Núñez V., Otero R., Barona J., Fonnegra R., Jiménez S., Ososrio R., Quintana J., Díaz A. 2004c: Inhibition of the Toxic Effects of *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Micrurus mipartitus* Snake Venoms by Plant Extracts. *Pharmaceutical Biology*, 42: 49-54.
- Ode O.J. y Asuzu I.U. 2006: The anti-snake venom activities of the methanolic extract of the bulb of *Crinum jagus* (Amaryllidaceae). *Toxicon*, 48: 331–342.
- Organization for Economic Cooperation and Development. 2001: Guidelines for testing of chemical. Guideline 423, acute oral toxicity– acute toxic class method. Paris.
- Otero R, Tobón GS, Gómez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, et al. 1992: Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos. *Acta Médica Colombiana*, 17: 229-249.
- Otero R., Núñez V., Jiménez S., Fonnegra R., Osorio R., Garcia M., Díaz A. 2000a: Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 493-504.
- Otero R., Núñez V., Jiménez S., Fonnegra R., Osorio R., Garcia M., Díaz A. 2000b: 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: 505-511.

Otero R., Núñez V., Barona J., Fonnegra R., Jiménez S., Osorio R., Saldarriaga M., Díaz A. 2000c: Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III. Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology, 73: 233-241.

Otero R., Gutiérrez J., Mesa MB., Duque E., Rodríguez O., Arango J., Gómez F., Toro A., Cano F., Rodríguez L., Caro E., Martínez J., Cornejo W., Gómez LM., Uribe F., Cárdenas S., Núñez V., Díaz A. 2002: Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40: 1107-1114.

Otero-Patiño, R. 2009: Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 54: 998-1011.

Pal M., Maiti AK., Roychowdhury UB., Basak S., Sukul B. 2010: Renal Pathological Changes in Poisonous Snake Bite. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 32: 19-21.

Patiño A., López J., Aristizábal M., Quintana J., Benjumea D. 2012: Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (*Zingiberaceae*) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, 32: 365-374.

Percy D.H. and Barthold S.W. 2007: Pathology of laboratory rodents and rabbits, 3th ed. USA; Blackwell Publishing. 325.

Pereañez A., Lobo-Echeverri T., Rojano B., Vargas L., Fernández M., Gaviria CA., Núñez V. 2010: Correlation of the inhibitory activity of phospholipase A₂

snake venom and the antioxidant activity of Colombian plant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 910-916.

Pereañez A., Núñez V., Patiño AC., Londoño M., Quintana JC. 2011: Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A₂. *Vitae*, 18: 295-304.

Pereañez A., Núñez V., Rojano B., Lobo-Echeverri T. 2013: Inhibitory effects of *Swietenia macrophylla* on myotoxic phospholipases A₂. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23: 885-894.

Pithayanukul P., Leanpolchareanchai J., Bavovada R. 2010: Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. *Phytotherapy Research*, 24: 56–62.

Rasband, W.S. 2014: ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

Rucavado A., Escalante T., Shannon J.D., Ayala-Castro C.N., Villalta M., Gutiérrez J.M. and Fox J.W. 2012: Efficacy of IgG and F(ab)² Antivenoms to Neutralize Snake Venom-induced Local Tissue Damage as Assessed by the Proteomic Analysis of Wound Exudate. *Journal of Proteome Research*, 11: 292–305.

Shilpi JA., Taufiq-Ur-Rahman MD., Uddin SJ., Shahanur Alam MD., Sadhu SK., Seidel V. 2006: Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 264-271.

Silva H, Alvarado R, Hidalgo J, Cerruti T, Dávila W, Mestanza M, et al.1998: Instituto de Medicina Tradicional (IMET)-Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS). *Bixa orellana* L. Monografías de Plantas Medicinales N° 02. Iquitos: IMET-IPSS: 12-20.

Sivigila, Boletín Epidemiológico semana 53, 2014. Fecha de consulta: 22 de enero de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2053.pdf>

Stohs SJ. 2013: Safety and efficacy of *Bixa orellana* (Achiote, Annatto) leaf extracts. Phytotherapy Research. Wiley Online Library.

Tan N.G., Fung S.Y., Sim S.M., Marinello E, Guerranti R., Aguiyi J.C. 2009: The protective effect of *Mucuna pruriens* seeds against snake venom poisoning. Journal of Ethnopharmacology, 123: 356–358.

Tan SK., Osman H., Wong KC., Boey PL. 2009: New phragmalin-type limonoids from *Swietenia macrophylla* King. Food Chemistry, 115: 1279-1285.

Teixeira C., Cury Y., Moreira V. Picolo G., Chaves F. 2009: Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. Toxicon, 54: 67-76.

Ticli FK., Hage LIS., Cambraia RS., Pereira PS., Magro AJ., Fontes MRM., *et al.* 2005: Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon, 46: 318-327.

Topyldiz S., Hayretdag S. 2012: Histopathological effects of *Montivipera xanthina* venom on rats. Turkish Journal of Zoology, 34: 517-525.

Villalobos JC, Mora R., Lomonte B., and Gutiérrez JM., Angulo Y. 2007: Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. Toxicology *in vitro*, 21: 1382-1389.

Viuda-Martos M., Ciro-Gómez G., Ruiz-Navajas Y., Zapata-Montoya JE., Sendra E., Pérez-Álvarez JA., Fernández-López J. 2012: *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. *Journal of Food Safety*, 32: 399-406.

World Health Organization. Listado de enfermedades desatendidas. 2009. Fecha de consulta: 26 de junio de 2012. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en

World Health Organization. Neglected Tropical Diseases; Snakebite. Fecha de consulta: 26 de junio de 2013. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/

Xu S.F., Zou B., Yang J., Yao P., Li C.M. 2012: Characterization of a highly polymeric proanthocyanidin fraction from persimmon pulp with strong Chinese cobra PLA₂ inhibition effects. *Fitoterapia*, 83: 153–160.

Yong YK, Zakaria ZA, Kadir AA, Somchit MN, Ee Cheng Lian G, Ahmad Z. 2013a: Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 13 (32): 1-7.

Yong YK., Kadir A.A., Sukardi S., Roslida A.H., Somchit M.N., Ahmad Z. 2011: *Bixa orellana* leaves extract inhibits Bradikynin-induced inflammation through suppression of Nitric Oxide Production. *Medical Principles and Practice*, 20: 142-146.

Yong, Y. K., Sulaiman, N., Hakim, M. N., Lian, G. E. C., Zakaria, Z. A., Othman, F., & Ahmad, Z. 2013b: Suppressions of Serotonin-Induced Increased Vascular Permeability and Leukocyte Infiltration by *Bixa orellana* Leaf

Extract. BioMed Research International, 2013: 1-7.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/463145>

Zhang Y., Zhong L., Zhou B., Chen J.Y., Li CM. 2013: Interaction of characteristic structural elements of persimmon tannin with Chinese cobra PLA₂. Toxicon, 74: 34–43.

ANEXO 1**FORMATO DE SEGUIMIENTO INDIVIDUAL**

PRUEBA: _____

TRATAMIENTO ADMINISTRADO: _____

CONTROL : _____

IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL: _____

EDAD EN SEMANAS: _____ SEXO: _____

PESO (gr): _____

FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO: _____

PESO ANTES DEL TRATAMIENTO (gr) Y CONDICIÓN CORPORAL (1-5): _____

TRATAMIENTO ADMINISTRADO, ESPECIFIQUE DOSIS Y HORA: _____

SEGUIMIENTO

FECHA Y HORA: _____ DÍA DE TRATAMIENTO: _____

N= NORMAL, A= ANORMAL, NE= NO EVALUADO, NO= NO SE OBSERVA

ESTADO GENERAL Y DE CONCIENCIA

CONDICIÓN CORPORAL		LETARGO	
ESTADO DE HIDRATACIÓN		SUEÑO	
PILOERECCIÓN		ESTUPOR	
ALERTA		COMA	

SISTEMA ORGÁNICO	N	A	NE	OBSERVACIÓN
NERVIOSO				
DIGESTIVO				
PIEL Y ANEXOS				
ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS				
RESPIRATORIO				

MUSCULO ESQUELÉTICO				
URINARIO				

En las observaciones escriba que alteración presenta según el sistema y su localización específica: NERVIOSO (temblores, convulsiones, ataxia, depresión, propiocepción disminuida), DIGESTIVO (sialorrea, diarrea, abdomen agudo, timpanismo), PIEL Y ANEXOS (Descamación, alopecia, eritema, prurito), ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS (transparencia, epifora, secreciones), RESPIRATORIO (secreciones, epistaxis, disnea, taquipnea, bradipnea, hipernea), CIRCULATORIO (presencia de hemorragias, estado de perfusión), URINARIO (anuria, oliguria).

SEGUIMIENTO

FECHA Y HORA: _____ DÍA DE TRATAMIENTO: _____

N= NORMAL, A= ANORMAL, NE= NO EVALUADO, NO= NO SE OBSERVA

ESTADO GENERAL Y DE CONCIENCIA

CONDICIÓN CORPORAL		LETARGO	
ESTADO DE HIDRATACIÓN		SUEÑO	
PILOERECCIÓN		ESTUPOR	
ALERTA		COMA	

SISTEMA ORGÁNICO	N	A	NE	OBSERVACIÓN
NERVIOSO				
DIGESTIVO				
PIEL Y ANEXOS				
ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS				
RESPIRATORIO				
MÚSCULO ESQUELÉTICO				
URINARIO				

ANEXO 2

FORMATO DE NECROPSIA

PRUEBA: _____

TRATAMIENTO ADMINISTRADO: _____

CONTROL : _____

IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL: _____

EDAD EN SEMANAS: _____ **SEXO:** _____

PESO (gr): _____ **CONDICIÓN CORPORAL (1-5):** _____

FECHA Y HORA DE MUERTE: _____

EXAMEN EXTERNO DEL CADAVER:

ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE ÓRGANOS

PIEL Y ANEXOS: _____

ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS: _____

S. DIGESTIVO: _____

S. RESPIRATORIO: _____

S. CARDIOVASCULAR: _____

S. GENITOURINARIO: _____

S. NERVIOSO: _____

S. MÚSCULO ESQUELÉTICO: _____

OBSERVACIONES: _____

ÓRGANOS REMITIDOS PARA HISTOPATOLOGÍA: _____

	ANEXO 3					
	Laboratorio de Patología					
	FORMATO DE ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO					
	TOXICIDAD AGUDA DE SM13-26,23					
Fecha:		Caso: No.		HC ó Identificación: Placa:		
Especie: Mus musculus		Cepa: Swiss Webster	Sexo:		Edad:	
Institución: OFIDISMO/ESCORPIONISMO			Remitente: Ana María Henao			
DESCRIPCIÓN MICROSCOPICA						
Órgano	1 Esófago	2 Estómago	3 Int. Delg.	4 Int. Gru.	5 Hígado	Observaciones
Lesión / Grado						
Deg. Turbia						
Deg. Vacuolar						
Deg. Grasa						
Atrofia						
Fibrosis						
Hiperplasia						
Cariomegalia						
Binucleación						
Pigmento						
Minerales						
Cilindros Proteicos						
Necrosis						
Apoptosis						
Congestión						
Edema						
Hemorragia						
Trombos						
PMN						
Eosinófilos						
Linfocitos						
Plasmocitos						
Macrófagos						
Diagnóstico:			Grado de Lesión			
			1. Sin lesión		4. Moderada	
			2. Lesión leve		5. Entre Moderada y Severa	
			3. Entre leve y moderada		6. Severa	
Observaciones Adicionales:						



ANEXO 3
Laboratorio de Patología
FORMATO DE ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO
TOXICIDAD AGUDA DE SM13-26,23

Fecha:		Caso: No.	HC ó Identificación:	Placa:
Especie: Mus musculus	Cepa: Swiss Webster	Sexo:	Especie: Mus musculus	
Institución: OFIDISMO/ESCORPIONISMO		Remitente: Ana María Henao		

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

Órgano	1 Bazo	2 Riñón	3 Corazón	4 Encéfalo	5 Pulmón	6 Gastrocnemio	Observaciones
Lesión / Grado							
Deg. Turbia							
Deg. Vacuolar							
Deg. Grasa							
Atrofia							
Fibrosis							
Hiperplasia							
Cariomegalia							
Binucleación							
Pigmento							
Minerales							
Cilindros Proteicos							
Necrosis							
Apoptosis							
Congestión							
Edema							
Hemorragia							
Trombos							
PMN							
Eosinófilos							
Linfocitos							
Plasmocitos							
Macrófagos							

Diagnóstico:	Grado de Lesión	
	1. Sin lesión	4. Moderada
	2. Lesión leve	5. Entre Moderada y Severa
	3. Entre leve y moderada	6. Severa

Observaciones Adicionales:



ANEXO 4	TRATAMIENTO USADO:
Laboratorio de Patología	
FORMATO DE ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	
PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA MIOTOXINA POR LOS EXTRACTOS	

Fecha:	Caso:	HC ó Identificación:	Placa:
Especie: Mus musculus	Cepa: Swiss Webster	Sexo:	Edad:

Institución: OFIDISMO/ESCORPIONISMO	Remitente: Ana María Henao
--	-----------------------------------

DESCRIPCIÓN MICROSCOPICA

Órgano	1 Músculo	2 Piel	3 Riñón	Tinción H-F + / -	Azul de Prusia + / -	Observaciones
Lesión / Grado						
Deg. Turbia						
Deg. Vacuolar						
Deg. Grasa						
Atrofia						
Fibrosis						
Hiperplasia						
Cariomegalia						
Binucleación						
Pigmento						
Minerales						
Cilindros Proteicos						
Hemorragia						
Apoptosis						
Congestión						
Edema						
PMN						
Linfocitos						
Plasmocitos						
Macrófagos						
Necrosis						

Diagnóstico:	Grado de Lesión	
	1. Sin lesión	4. Moderada
	2. Lesión leve	5. Entre Moderada y Severa
	3. Entre leve y moderada	6. Severa

Observaciones Adicionales: