

T
499

90856



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

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

TESIS

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

PRESENTA

M. en C. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

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

Abril del 2004



El presente trabajo de investigación se realizó en:

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

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

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

Comité revisor

Dra. Mariana Meckes Fischer

Dr. Rubén Román Ramos

Dr. Jaime Tortoriello García

Dr. Héctor Ponce Monter

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

A: Adi, Emely e Itzia

Quiero agradecer cumplidamente a:

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

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

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

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

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

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

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



INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Antecedentes	7
El alacranismo en México	7
Fisiopatología de la intoxicación por picadura de alacrán	10
Toxinas del veneno de alacrán.	12
Efecto del veneno sobre el páncreas	17
Efectos del veneno de alacrán sobre el sistema cardiovascular.	19
Antecedentes Etnobotánicos, Farmacológicos y Químicos de la <i>Aristolochia elegans</i> y de la <i>Bouvardia ternifolia</i> .	21
Justificación y planteamiento del problema	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Material y métodos	26
Material vegetal	26
Preparación de los extractos	26
Preparación de veneno de alacrán de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> .	26
Animales de experimentación	27
Pruebas de toxicidad aguda de las plantas medicinales	27
Efectos de los extractos vegetales sobre la letalidad del veneno del alacrán <i>Centruroides limpidus limpidus</i>	27
Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	28
a) Modelo de íleon aislado de cobayo	28

b) Modelo de aurículas aisladas de rata.	29
c) Inflamación neurogénica en páncreas aislado de rata medida por extravasación de azul de Evans	30
d) Liberación de amilasa en el páncreas aislado de Ratón	31
e) Determinación de la amilasa por el método amiloclástico yodométrico	32
f) Determinación de parámetros cinéticos de amilasa	32
g) Determinación de amilasa por un método Inmunoenzimático	33
h) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de origen porcino y de origen murino	33
i) Esquema de inmunización de cobayos	34
Análisis estadístico	34
Resultados	35
Obtención de los extractos	35
Pruebas de toxicidad de los extractos vegetales	35
Efecto producido por los extractos vegetales sobre la DL ₅₀ del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en ratón	35
Evaluación del efecto producido por los extractos vegetales sobre la contracción inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en el íleon aislado de cobayo	36
Evaluación del efecto inotrópico y cronotrópico del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> en aurículas aisladas de ratas y los efectos antagónicos de los extractos vegetales	38
Efectos de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i> y <i>Bouvardia ternifolia</i> en la liberación de amilasa inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre el páncreas aislado de ratón	45

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

Índice de Figuras

Figura 1. Sitios de unión hipotéticos para las toxinas específicas al canal de sodio	14
Figura 2. Modelo didáctico del canal de sodio voltaje-dependiente, que muestra la cinética del canal	14
Figura 3. Esquema de los elementos estructurales del canal de sodio voltaje-dependiente	15
Figura 4. Registro de contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> y efecto del extracto de <i>Aristolochia elegans</i> .	37
Figura 5. Registro de contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> y efecto del extracto de <i>Bouvardia temifolia</i> Schtdl	37
Figura 6. Inhibición de la contracción de íleon aislado de cobayo producido por el veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i> y <i>Bouvardia temifolia</i>	38
Figura 7. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Bouvardia temifolia</i>	39
Figura 8. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Bouvardia temifolia</i>	39
Figura 9. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i>	40
Figura 10. Efecto del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata y el efecto de los extractos de <i>Aristolochia elegans</i>	40
Figura 11. Registro actividad contráctil de aurículas Aisladas de rata y el efecto de veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> , y el efecto antagónico del extracto hexánico de <i>Bouvardia temifolia</i>	41
Figura 12. Detalle del registro del comportamiento basal de la contracción de aurícula de rata	42
Figura 13. Detalle del registro del efecto del veneno sobre la contracción de aurícula de rata en el periodo que cubre del segundo 70 al 74	43

Figura 14. Detalle del registro del efecto del veneno sobre la contracción de aurícula de rata en el periodo que cubre del segundo 77 al 81	43
Figura 15. Detalle del Registro del efecto del extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i> en el periodo que cubre del segundo 100 al 124	44
Figura 16. Curva de concentración-respuesta liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón. El efecto del tiempo exposición veneno	45
Figura 17. Velocidad de liberación de amilasa en Páncreas aislado de ratón	46
Figura 18. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón	47
Figura 19. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), para la determinación de las constantes cinéticas de la amilasa pancreática	48
Figura 20. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia de extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	49
Figura 21. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	49
Figura 22. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia de extracto metanólico de <i>Bouvardia ternifolia</i> .	50
Figura 23. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto metanólico de <i>Bouvardia ternifolia</i>	51
Figura 24. Representación dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico, extracto metanólico de <i>Bouvardia ternifolia</i> comparado y sin extractos	51
Figura 25. Efecto de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón	52
Figura 26. Efecto de los extractos de <i>Aristolochia Elegans</i> sobre la liberación de amilasa en páncreas Aislado de ratón	54

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

Indice de Tablas

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

RESUMEN

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

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

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

ABSTRACT

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

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

The hexanic and methanolic extract from *B. ternifolia* modified the LD₅₀ of *C. limpidus limpidus* venom from 0.750 mgKg⁻¹ to 1.64 and 1 16 mg·Kg⁻¹, respectively. The hexanic and methanolic extracts of *A. elegans* produced lower antitoxic activity, 1.04 and 0.984 mg·Kg⁻¹ respectively. On *in vitro* test, addition of *B. ternifolia* and *A. elegans* extracts inhibited significantly isolated guinea pig ileum contraction, isolated rat atria positive inotropic effect, acute inflammation of whole rat pancreas and the amylase release in the isolated mice pancreas, all these induced by scorpion venom in a concentration dependent mode. In general, the results demonstrated the

effectiveness of these two plant species for decreasing the lethality and the toxic effects of *C. limpidus limpidus* venom in experimental model.

INTRODUCCIÓN.

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

Es necesario resaltar que el veneno de alacrán desencadena en los animales de laboratorio un cuadro fisiopatológico complejo, constituyendo este un modelo farmacológico excelente, para el estudio del padecimiento y también, para el análisis de las plantas que han sido usadas para tratar el envenenamiento por picadura de alacrán.

Basados en el esquema del cuadro fisiopatológico se pueden proponer varios modelos, *in vitro* e *in vivo* que permiten esclarecer los mecanismos involucrados en la intoxicación. Es el caso de las afecciones cardíacas resultado de la liberación masiva de neurotransmisores como ACh y catecolaminas, o por la modificación en la excitabilidad de las células del músculo cardíaco. Otros procesos fisiológicos que se alteran ocurren como consecuencia de la inflamación que resulta de la intoxicación, como es el caso del edema agudo de pulmón y de páncreas el que puede ser monitoreado determinando la extravasación de la albúmina sérica. Cabría también mencionar alteraciones en la presión arterial así como en los procesos neurológicos.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antitóxica de algunas plantas medicinales tradicionalmente utilizadas en la herbolaria mexicana para el tratamiento de los síntomas por envenenamiento por picadura de alacrán, como tal es el caso de *Bouvardia terniflora* y *Aristolochia elegans*. El estudio se llevó a cabo en diferentes modelos para evaluar el efecto del extracto vegetal sobre la DL_{50} del veneno de alacrán en ratones sanos, la contracción inducida con veneno en el íleon aislado de cobayo, la fuerza de contracción de aurículas aisladas de rata, la pancreatitis en la rata íntegra, el efecto secretagogo en páncreas y sobre la cinética enzimática de la amilasa.

El propósito de la investigación farmacológica de extractos de plantas medicinales va más allá que el justificar la información etnobotánica sobre el uso de los recursos vegetales. El avance en el conocimiento fitoquímico y farmacológico de la plantas, aplicando tecnología moderna ha generado la producción de novedosos fitomedicamentos, constituidos por una mezcla de compuestos, cuyo efecto puede ser el resultado de una acción sinérgica o aditiva entre sus constituyentes, siendo la principal ventaja de los fitomedicamentos el contar en un solo producto, con una alternativa para manejar la complejidad de un cuadro patológico como es el caso de la picadura de alacrán.

ANTECEDENTES.

El alacranismo en México

Los alacranes son uno de los grupos de animales más antiguos sobre la tierra (más de 400 millones de años de evolución), pertenecen a la clase Arachnidae, orden scorpionida y están representados por 1500 especies distribuidas alrededor del mundo y agrupadas en seis familias: Buthidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Chactidae, Vejoidae y Bothriuridae. Aunque todos los alacranes son venenosos, menos de 50 especies (pertenecientes a la familia Buthidae) se consideran como peligrosas para el hombre (Keegan 1980, Dehesa-Dávila y col. 1995, Hoffman 1993).

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

Debido a las características geográficas, en todo el territorio mexicano por debajo de los 2500 metros, con una gran variedad de ambientes y una enorme diversidad de flora y fauna, existen especies diversas de animales ponzoñosos y entre ellos los alacranes. Anualmente, en el mundo se reporta

un número considerable de muertes por picadura de alacrán, siendo nuestro país uno de los que presentan los más altos índices de morbilidad. De las 136 especies y subespecies de alacranes que se encuentran en México, sólo ocho tienen importancia clínica (Hoffmann y Nieto 1939; Dehesa-Dávila y col. 1995), siendo los del género *Centruroides* los responsables de la mayoría de los accidentes. Las especies que pertenecen a este género se distribuyen en la región litoral del océano Pacífico, en la cuenca del río Balsas, algunos estados centro-occidentales y en el noreste del país.

La distribución geográfica específica del género *Centruroides* de importancia para la salud pública es: *C. elegans* (Nayarit, Jalisco, Michoacán, Colima y Guerrero), *C. infamatus infamatus* (Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato y Michoacán), *C. limpidus limpidus* (Colima, Morelos y Guerrero), *C. limpidus tecomanus* (Colima), *C. noxius* (Nayarit), *C. pallidiceps* (Sonora, Sinaloa y Arizona EUA), *C. sculpturatus* (Sonora; Arizona y Nuevo México EUA), *C. suffusus suffusus* (Durango) (SSA 1999; Dehesa-Dávila y Posanni 1994). Los estados de Colima, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla y Sinaloa, presentan la mayor incidencia de picadura de alacrán. Según los registros de la Secretaría de Salud, el número de accidentes por año se ha ido incrementando, sin embargo, se estima que estos datos representan un 25% del total de los accidentes, estimación que se debe, probablemente, a que existe un subregistro de los casos. La falta de exactitud en los registros respecto al número de accidentes y muertos que se presentan anualmente, explica en parte las inconsistencias de los datos que se observan en la tabla 1. Se estima que

hay alrededor de 300,000 intoxicados por picadura de alacrán por año, con una mortalidad de entre 1000 - 2000 muertes (WHO 1981). En el 2002 se señalaron más de 220 000 casos de intoxicación en la República Mexicana (SSA 2002), además, se estima que 8 de 10 defunciones debidas a las picaduras de alacrán se concentran en los estados de Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla y Morelos (Granja y col. 1999).

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

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

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

Tabla 2. Tasa de accidentes por picadura de alacrán, de acuerdo a la población reportada en el Censo de Población y Vivienda del año 2000 (INEGI).

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

Fisiopatología de la intoxicación por picadura de alacrán.

Como consecuencia de la liberación súbita y masiva de ACh y de catecolaminas en las terminales nerviosas, como consecuencia de la sobreestimulación que efectúan las toxinas del veneno de alacrán, sobre los canales de sodio activados por voltaje (Bablito y col. 1986; Matos y col. 1999). El veneno de provoca alteraciones funcionales en diversos órganos y tejidos. Esto explica los daños neurológicos, cardiovasculares, hemodinámicos, con cambios electrocardiográficos, metabólicos y hormonales, así como el del edema pulmonar y pancreático (Karnad 1998, Bawaskar y Bawaskar 1997; Gueron y Sofer 1994). El envenenamiento por picadura de alacrán se ha catalogado como un síndrome de déficit de energía y de la capacidad de los órganos vitales para utilizar los sustratos

metabólicos existentes, lo cual provoca una "falla orgánica multi sistema" y en el peor de los casos la muerte (Murugesan 1999).

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

La semiología del padecimiento puede ser explicada con base en la capacidad que poseen las toxinas del veneno de alacrán para actuar sobre los canales de sodio de las terminales neuronales. Estas toxinas provocan la despolarización de membranas axonales con la consecuente liberación masiva de neurotransmisores, los cuales, estimulan a varios órganos incluyendo el intestino, corazón y tejido vascular. Existen evidencias experimentales de que la acetilcolina (ACh) y la noradrenalina son los mediadores de muchas de las alteraciones fisiológicas producidas por el veneno (Cunha-Melo col. 1973; Romano-Silva col. 1994; Matos y col. 1999^a; Matos y col. 1999^b).

La salivación excesiva, la náusea, el vómito, el incremento de la motilidad intestinal y la distensión abdominal que se observan frecuentemente, son manifestaciones parasimpáticas que se explican

básicamente por la acción de las toxinas sobre las neuronas colinérgicas del nervio vago (Dehesa-Dávila, y col. 1995).

Toxinas del veneno de alacrán.

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

Existen diferentes familias de toxinas que han sido clasificadas con la especificidad que tienen sobre los canales iónicos, como los de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{++} . Dentro del género *Centruroides* hay dos grupos de péptidos parecidos estructuralmente. Los péptidos de cadena grande afectan al canal de Na^+ dependiente de voltaje y los de cadena corta bloquean al canal de K^+ dependiente de voltaje del tipo Kv1 (Possani y col. 1999) y ERG ("Ergotoxin-like genes") (Corona y col. 2002). De tal forma, que las acciones de las toxinas se ejercen principalmente sobre las membranas de las células excitables como las células nerviosas y del tejido muscular. La unión de estas toxinas a los canales catiónicos es causante de muchos de los síntomas tóxicos del veneno (Dehesa-Dávila y col. 1995).

Las toxinas de alacrán que actúan sobre el canal de Na^+ son péptidos que están compuestos de 60-76 aminoácidos, altamente estables por su bajo

peso molecular y por 4 puentes disulfuro que consolidan la estructura tridimensional (Caterall 1980; Fontecilla-Camps y col. 1980; Leberthon y col. 1994; Possani y col. 1999). Estas toxinas modulan los mecanismos de disparo de las células excitables y, dependiendo de la forma en que lo hacen, se dividen en dos grupos: toxinas α y β (Bontems y col. 1991; Bruix y col. 1993).

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

Las toxinas α se unen al sitio 3 del canal de Na^+ (Gordon y col. 1996; Rogers y col. 1996, Bablito y col. 1986) en la zona extracelular (Rogers y col. 1996) y retrasan o bloquean la inactivación rápida (Gordon y col. 1996; Bablito y col. 1996), inhibiendo el cierre de la compuerta de inactivación permitiendo la corriente de sodio, prolongando los potenciales de acción (Gordon y col. 1996, Roger y col. 1996), bloqueando la cinética de inactivación rápida (Gordon y col. 1996, Bablito y col. 1986) de manera dependiente del voltaje (figura 1).

Las toxinas β se unen al sitio 4, modifican los mecanismos de activación sin alterar la inactivación; comparado con la actividad de las

toxinas α , presenta un menor efecto en cuanto a las corrientes de Na^+ (Bablito y col. 1986), prolongando significativamente la apertura del canal e incrementando la corriente de sodio. Estas toxinas se unen al canal de Na^+ de manera independiente del voltaje (Yatani y col. 1988) (figura 2)

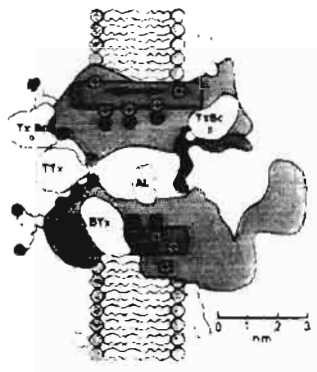


Figura 1. Sitios de unión hipotéticos para toxinas específicas al canal de sodio. (TTx) tetrodotoxina, (BTX) batracotoxina, (AL) anestésicos locales, (TxSc α) alacranes africanos-europeos, (TxSc β) alacranes americanos.

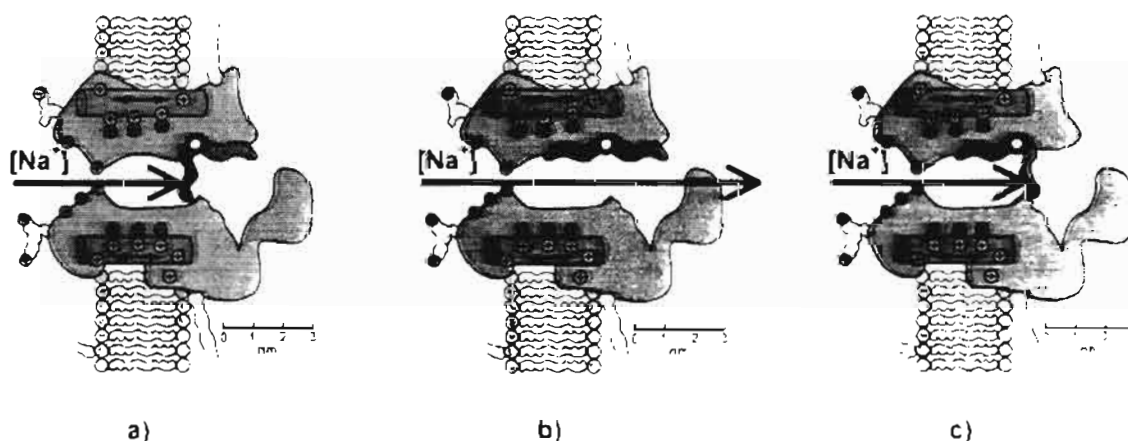


Figura 2. Modelo didáctico canal de sodio voltaje dependiente, que muestra la cinética del canal. En panel a) el canal se encuentra en reposo a un voltaje de -90 mV . en b) el canal se encuentra activado a un voltaje de $-90 \text{ a } +35 \text{ mV}$ y en c) el canal se encuentra inactivo en un voltaje de $+35 \text{ mV}$. Los cambios conformacionales de las

En el mamífero los canales de sodio dependientes de voltaje, constituyen un complejo de glicoproteínas con tres subunidades transmembranales α , β_1 y β_2 (Gordon y col. 1996) (figura 3).

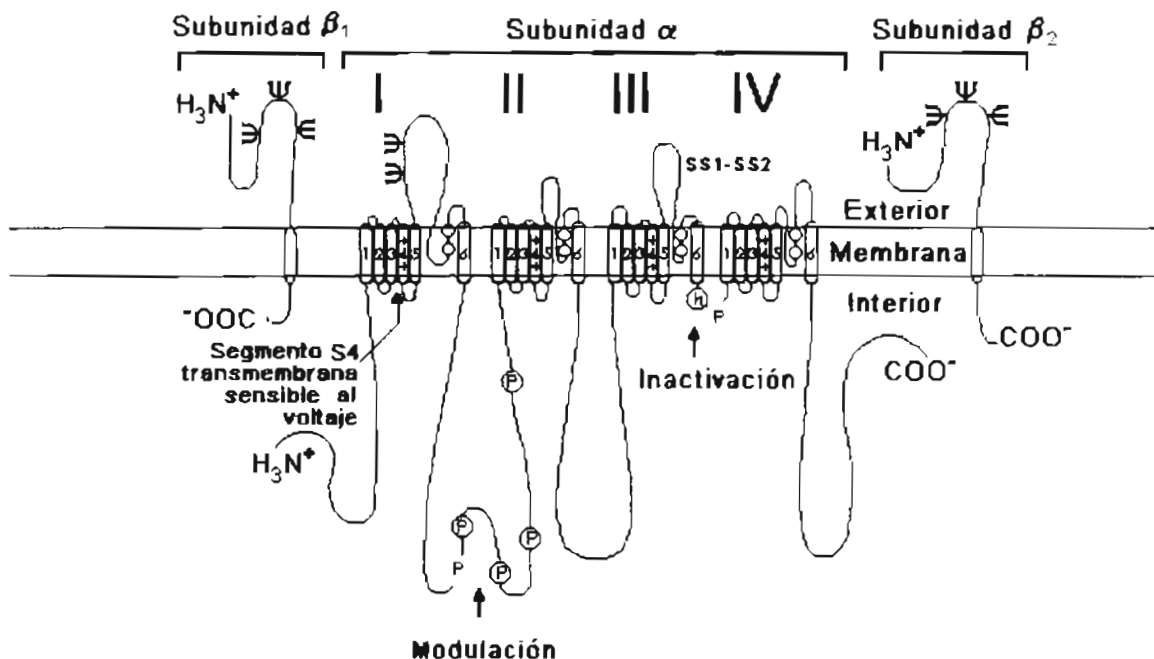


Figura 3. Esquema de los elementos estructurales del canal de sodio voltaje dependiente.

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

modificaciones en el potencial de membrana y provocan cambios conformacionales en la compuerta *h*, los residuos de lisina o arginina con carga positiva del S4 se unen a las cargas negativas del espacio intracelular (Rogers y col. 1996). La compuerta de inactivación es un dominio intracelular corto que conecta los dominios intracelulares III y IV y probablemente se pliega hacia el interior de la boca intracelular del poro, ocluyéndolo unas milésimas de segundo después de abrirse el canal (Rogers y col. 1996)

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

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

col. 1997). Las toxinas específicas para el canal de potasio son péptidos que contienen 29 a 39 aminoácidos y son estabilizados por tres puentes disulfuro (Possani 1999).

Efecto del veneno sobre el páncreas

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

A nivel celular, el desarrollo de la pancreatitis inducida por la intoxicación con veneno de alacrán provoca la presencia de grandes agregados en la región comprendida entre la región *cis* del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico de las células acinares (Possani 1991), hecho que se corrobora con estudios de microscopía electrónica, y se observa que éstos son estructuras formadas por elementos tubulares (Fletcher 1994). En

las células acinares, también se ha visto que durante el consumo exhaustivo del ATP por anoxia con N₂, se forman tales agregados.

El 60% de las muertes que ocurre en pacientes con pancreatitis aguda sucede en los primeros 7 días, después de la picadura, con falla respiratoria aguda, la relación entre estos dos eventos no está del todo clara (Zhou 1992). Sin embargo, la liberación de enzimas proteolíticas o hidrolíticas derivadas del páncreas hacia la circulación sistémica determina el desarrollo del daño pulmonar. El daño pancreático también provoca la liberación de otros mediadores celulares como el "Factor Activador de Plaquetas" (PAF, por sus siglas en inglés), éste es un potente mediador químico en el proceso inflamatorio y está bien establecido como mediador del daño pulmonar. Los efectos del PAF a nivel pulmonar no se explican fácilmente después de que el páncreas libera PAF o enzimas hidrolíticas, es evidente que no es un mecanismo simple, ya que por ejemplo la administración endovenosa de fosfolipasa A₂ provoca daño pulmonar en ratas con pancreatitis y no produce daño en ratas normales, lo que indica que existe un conjunto de factores involucrados en el daño pulmonar (Matos 1997)

El edema pulmonar agudo, especialmente en la población infantil, es signo de mal pronóstico, que regularmente va acompañado por una letalidad significativamente alta (Amaral 1992). En la rata, dos mecanismos distintos parecen explicar el daño pulmonar posterior a la intoxicación con veneno de alacrán: el primero, es la falla ventricular izquierda aguda debida a una hipertensión arterial sistémica seguida de una liberación de catecolaminas. el segundo, es el incremento de la permeabilidad vascular debido a la

liberación de mediadores de la inflamación como el PAF. La administración de heparina o de antagonistas del PAF previenen el edema agudo de pulmón provocado por veneno de *Tityus serrulatus* (Amaral 1993), la heparina reduce la permeabilidad vascular producida por histamina, bradicidina y prostaglandinas. Asimismo la inyección previa de inhibidores de la 5-lipoxigenasa (MK-886) o ciclooxigenasa (aspirina o indometacina) disminuye la magnitud del edema inducido por el veneno de alacrán (Matos 1999^a). Otro mecanismo posible es que el veneno induzca la liberación de neuropéptidos como la sustancia P. Esto se ha observado en el modelo de íleon aislado de cobayo (Matos 1999^a), este neuropéptido, a su vez, induce la liberación de mediadores de la inflamación en leucocitos, células cebadas y macrófagos (Brain 1997; Ho 1998).

Efectos del veneno de alacrán sobre el sistema cardiovascular.

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

En general, se considera que los efectos cardiovasculares después de la intoxicación están mediados por la estimulación del sistema nervioso autónomo, predominantemente del sistema simpático. La liberación tisular y

medular de catecolaminas produce un marcado cronotropismo e inotropismo que son bloqueados por fármacos como el propranolol que es un β -bloqueador adrenérgico, lo que implica la naturaleza noradrenérgica del efecto (Teixeira 2001). Además, se presenta bradicardia tardía la cual es inhibida por la atropina, efecto que ocurre a nivel de los receptores colinérgicos y que involucra inhibición de la adenilciclase y aumento de la conductancia a K^+ dando lugar a los efectos cronotrópico e inotrópico negativos de la ACh en el corazón (Lefkowitz 1996). La bradicardia tardía es fatal en el cuadro clínico del envenenamiento con toxinas de alacrán (Goyffon 1982), probablemente por la isquemia miocárdica y fatiga celular más que por la acción de la ACh (Gueron 1980).

Otra acción del veneno importante de señalar es la capacidad de que tiene para modificar directamente la excitabilidad de la membrana de los miocitos. Estas células tienen canales de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje, los cuales son susceptibles de ser afectados por el veneno (Teixeira 2001). La mayoría de los venenos producen hipertensión pronunciada, tanto en los animales de experimentación como en los pacientes con intoxicación, sobretodo niños. Este efecto se considera como el principal factor responsable de la insuficiencia cardíaca, así como del edema agudo de pulmón (Gueron 1992). La hipertensión secundaria a la picadura de alacrán también se asocia a la liberación masiva de catecolaminas, un fenómeno similar ocurre en el feocromocitoma. Aunque existe una diferencia importante, la hipertensión en el feocromocitoma es de corta duración

desaparece, en muchos casos, entre 15 y 60 minutos, provocando insuficiencia cardíaca. En cambio, el veneno provoca una hipertensión de larga duración, cuadro que es más complejo y que no se explica simplemente por la liberación masiva de las catecolaminas de las terminales nerviosas sistémicas y de la médula adrenal (Ismail 1995). Hay dos mecanismos por los cuales el veneno de alacrán puede producir aumento en la liberación de catecolaminas: 1) estimulación sobre las terminales nerviosas simpáticas con aumento de la secreción 2) la médula suprarrenal a través de la liberación de ACh por las fibras preganglionares y su interacción con los receptores nicotínicos de las células cromafines.

La hipertensión secundaria a la intoxicación se produce también por vasoconstricción periférica (que explica también la palidez) por aumento en la fuerza contráctil del corazón a través de mediadores β -adrenérgicos (Lefkowitz 1996). También involucra la liberación de renina por estimulación simpática β_1 de las células yuxtaglomerulares del riñón, hecho que se demuestra con la elevación de los niveles séricos de renina y aldosterona en pacientes con síntomas sistémicos ocasionados por veneno de alacrán (Gueron 1992).

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

Aristolochia elegans Mast. perteneciente a la familia Aristolochiaceae, es probablemente la especie vegetal más utilizada en el Estado de Morelos para el tratamiento de la intoxicación de pacientes con veneno de alacrán

De hecho la familia Aristolochiaceae es muy conocida desde la antigüedad por sus aplicaciones terapéuticas, tales como: uterotónico, emenagogo, expectorante y antiespasmódico (Hernández 1969). Esta planta es utilizada en México como antimicrobiano, antitumoral, antidiarreico, antipirético, antiviperino y emenagogo (INI, 1994). Se ha demostrado farmacológicamente que las especies de *Aristolochia* poseen actividad antiinflamatoria, relacionada ésta propiedad a la presencia del ácido aristolóquico, una sustancia característica del género. El ácido aristolóquico, un terpeno, un inhibidor específico de la fosfolipasa y por lo tanto es capaz de disminuir la liberación de mediadores pro inflamatorios y del dolor (Hutt and Houghton, 1998). También se ha demostrado que, debido a sus propiedades anticolinérgicas, los extractos obtenidos a partir de diferentes especies del género, modifican la actividad contráctil del íleon aislado de cobayo (Rastrelli, 1997).

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

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

De acuerdo con lo anteriormente expuesto se puede plantear la siguiente pregunta de investigación: "¿*Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* antagonizan los efectos tóxicos del veneno de alacrán *C. limpidus limpidus*, observados en el animal integro, ileon aislado de cobayo, aurícula aislada de rata y páncreas de ratas intoxicadas?

HIPÓTESIS

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

OBJETIVO GENERAL.

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Evaluar la modificación causada por los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia* sobre la toxicidad del veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, por aumento de la DL_{50} en ratones.

Cuantificar la CE_{50} del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en íleon aislado de cobayo, aurículas aisladas de rata y páncreas aislado de ratón en presencia de diferentes extractos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*.

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

MATERIAL Y METODOS.

Material vegetal

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

Preparación de los extractos.

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

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

El veneno fue obtenido de una colonia de alacranes colectados de la región de Puente de Ixtla, Morelos y mantenidos en nuestro laboratorio. El

veneno fue recolectado en cajas de Petri, por medio de un pulso eléctrico aplicado directamente al telson de los animales. El material obtenido fue clarificado por centrifugación y posteriormente liofilizado y almacenado a -70°C. Para los ensayos, el veneno se disolvió en solución salina isotónica.

Animales de experimentación

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

Pruebas de toxicidad aguda de las plantas medicinales.

Los efectos letales producidos por los extractos vegetales se determinaron de acuerdo al siguiente procedimiento: En la prueba se administraron a crecientes de los extractos (7.5, 15, 30, 60 y $120 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), a un grupo de 6 ratones, a los que se les administró un volumen constante de 0.5 ml por vía intravenosa (iv) por la vena caudal. La mortalidad fue evaluada a las 24 horas posteriores a la inyección.

Efectos de los extractos vegetales sobre la letalidad que produce el veneno *Centruroides limpidus limpidus*.

Cinco grupos de seis ratones de ambos sexos, fueron tratados con dosis crecientes del veneno: 0.69, 0.79, 0.908, 1.044 y 1.2 mg·Kg⁻¹ disueltos en un volumen total de 0.5 ml. Los extractos se disolvieron en solución salina isotónica y 1% de Tween 20®, y se administraron simultáneamente con el veneno *i.v.* por la vena caudal en dosis final de 50 mg/Kg. Otros cinco grupos de seis ratones recibieron las misma dosis de veneno y sirvieron como grupos control. La mortalidad se determinó a las 24 h post-inoculación.

Pruebas de antagonismo *in vitro*.

a) Modelo del íleon aislado de cobayo.

Los cobayos fueron sacrificados por dislocación cervical, el íleon distal fue obtenido por laparotomía y se lavó cuidadosamente con solución Tyrode; una sección de 2 cm del tejido fue disecado y colocado en una cámara para órganos aislados con una capacidad de 3 ml. Por medio de un hilo de seda uno de los extremos del tejido se sujetó, mientras que el otro fue atado a un transductor de fuerza conectado a un equipo digital de adquisición de datos Maclab 8. El tejido tensado a 1 g se mantuvo a 37°C en solución Tyrode (NaCl 136.9, glucosa 11.1, NaHCO₃ 11.9, CaCl₂ 1.4, KCl 2.7, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.4 mM, pH 7.4) y burbujeado con una mezcla de CO₂ 5% y O₂ 95%. Después de un periodo de 20 minutos de estabilización del tejido, a las condiciones de ensayo, se adicionó una solución de acetilcolina (Sigma) a una concentración final de 1 x 10⁻⁴ M. La respuesta contráctil inducida con ACh se consideró el efecto máximo (100%). Después de lavar cinco veces el

tejido, se adicionaron alícuotas del veneno para ajustar a concentraciones crecientes ($0.2 - 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se construyó una curva concentración respuesta, para determinar la concentración de veneno a la que se obtiene la mayor respuesta. Finalmente los extractos de las plantas fueron adicionados a la cámara a las concentraciones de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 y $360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, contra la concentración de veneno determinada en el anterior ensayo y su efecto fue evaluado en una curva de relajación.

b) Modelo de aurículas aisladas de rata.

Las aurículas se aislaron de ratas sacrificadas por decapitación, el tejido disecado se mantuvo en solución de Ringer – Krebs (NaCl 119, glucosa 11.1, NaHCO_3 25.0, CaCl_2 2.5, KCl 4.7, MgCl_2 1.0, NaH_2PO_4 1.2 mM, pH 7.4), a 37°C y burbujeado con una mezcla de CO_2 5% y O_2 95%. Las aurículas fueron colocadas en una cámara de perfusión de 2 ml sujetas al fondo de la cámara con un hilo de seda y atando el otro extremo a un transductor de fuerza, conectado a un equipo digital de adquisición de datos Maclab 8. El tejido se lavó cada 10 minutos hasta que se estabilizó la preparación, al final de este periodo, se registraron las contracciones espontáneas determinando las condiciones basales de fuerza y la frecuencia de contracción. A la cámara de perfusión se adicionaron concentraciones crecientes de veneno ($0.35, 0.75, 1.5$ y $2.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a los 60 segundos se agregaron $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia*

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

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

Este procedimiento se basa en el método descrito por Saria y Lundberg (1983), en el cual se demuestra que el azul de Evans administrado a ratas (*i.v.*) en el espacio vascular, se une fuertemente a la albúmina sérica, por lo que se mantiene en circulación y es retenido en el compartimiento vascular. Cuando se presenta una discontinuidad en la barrera endotelial, ocurre la extravasación de la seroalbúmina, el azul de Evans fluye hacia al espacio intersticial y entonces puede ser cuantificado en el tejido. En este experimento, el Azul de Evans se administró por la vena femoral (a una dosis de $30 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, en una solución de 3% en NaCl 0.9%), a grupos de 5 ratas cada uno, previamente anestesiadas con pentobarbital sódico ($40 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ *i.p.*). Cinco minutos después se administraron diferentes dosis de veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (1, 20, 100 y $500 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$, *i.p.*). Después de una hora, los animales fueron perfundidos por la vía endovenosa con 50 ml de amortiguador de fosfato salino adicionado de 100 unidades mL^{-1} de heparina, posteriormente se administró por la misma vía 200 ml de buffer de citratos 500 mM pH 3.5 adicionado de 1% de formaldehído. Una vez eliminada la sangre del espacio vascular, el páncreas se disecó por laparatomía, se pesó e incubó 48 horas en formamida para extraer el azul

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

de Evans del intersticio, el colorante fue cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm. Para evaluar el efecto antiinflamatorio de las plantas sobre el edema pancreático producido por el veneno, se administraron vía *i.p.* los extractos hexánicos y metanólicos de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia tenifolia* a cuatro de los grupos de animales intoxicados. La administración de los extractos se realizó antes de la administración del azul de Evans, con una dosis de 50 mg·Kg⁻¹.

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

El páncreas fue removido de ratones anestesiados (pentobarbital sódico 40 mg·Kg⁻¹). Inmediatamente después se separaron los lóbulos y lavados con solución amortiguadora de fosfato 0.1 M y NaCl 0.15 M, pH 7.2. El páncreas separado fue sujetado con una seda calibre 2/0 en una cámara de vidrio de 2 ml, en solución Tyrode con un burbujeo continuo con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂ a 37° C lavando el tejido cada 15 minutos. Una vez estabilizada la preparación el tejido se adicionaron diferentes concentraciones de veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (0.00032, 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2 y 1 mg·mL⁻¹) y se tomaron muestras del medio de incubación (200µl) después de 5, 10 y 15 minutos. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20°C y se procedió luego a la cuantificación de la amilasa por el método amiloclástico yodométrico. Con el fin de determinar el efecto antagónico de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia tenifolia*; los extractos se adicionaron 2

minutos antes de la adición del veneno de alacrán a una concentración de $0.039 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

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

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

f) Determinación de parámetros cinéticos de amilasa.

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

metanólico de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*, se realizó la determinación de los parámetros cinéticos de la amilasa en presencia de los extractos vegetales.

g) Determinación de amilasa por un método inmunoenzimático.

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

h) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de origen porcino y de ratón por un programa de computo PCGENE.

La inmunización de los cobayos se llevó a cabo utilizando amilasa pancreática de origen porcino. Para establecer el cruce inmunológico de la amilasa de origen porcino y de ratón se ingresaron las secuencias de ambas enzimas reportadas en la literatura al programa PCGENE. la homología entre las secuencias se estableció por comparación de toda la secuencia eliminando en ambas proteínas el péptido líder y por comparación de los

segmentos de mayor índice de hidrofiliidad tanto en identidad, como en similitud.

i) Esquema de inmunización de cobayos

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

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

La determinación de DL_{50} se realizó por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). El intervalo de la determinación se realizó entre DL_{16} y DL_{84} .

RESULTADOS.

Preparación de los extractos.

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

Pruebas de toxicidad de los extractos vegetales

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

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

La administración i.v. del veneno de *C. limpidus limpidus* en ratones resultó en una $DL_{50} = 0.75 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Cuando el veneno se administró simultáneamente con el extracto hexánico o el metanólico de *Bouvardia ternifolia*, se incrementó la DL_{50} a 1.64 y $1.16 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ respectivamente, siendo éstos los extractos que presentaron mayor efecto inhibitorio de la acción tóxica del veneno con 118 y 55% respectivamente. Los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* mostraron una menor capacidad antitóxica, incrementando la DL_{50} a 1.04 y $0.98 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectivamente; que corresponde a una disminución de la toxicidad de 31.2 y 38.8% (tabla 3).

El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre ambos extractos de *Bouvardia ternifolia* y con el metanólico de *A. elegans*.

Tabla 3. Determinación de la DL₅₀ del veneno en presenencia y ausencia de los extractos vegetales. Se muestra el promedio de 3 determinaciones.

	Veneno	MeOH Ae	Hexa Ae	MeOH Bt	Hexa Bt
DL ₅₀ mg·Kg ⁻¹	0.750	0.984	1.041	1.167	1.640
D.E.	0.088	0.059	0.279	0.139	0.194
p		0.009	0.082	0.004	0.004

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

En las figuras 4 y 5 se muestra un registro del comportamiento de la fuerza de contracción del íleon aislado de cobayo, en el tiempo en el que transcurrió el ensayo. En condiciones de reposo la tensión se mantuvo a una tensión de 1 g, la adición del veneno *C. limpidus limpidus* indujo una contracción sustancial del tejido por un periodo de 6 a 7 min, posteriormente se observó una disminución gradual de la fuerza de contracción con respuestas contráctiles repetitivas de baja intensidad. Después de este periodo el tejido se agota y no responde al estímulo con ACh. El efecto del veneno fue inhibido hasta en un 70%, de manera concentración dependiente

con la adición de los extractos hexánico de *B. ternifolia* (40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}$) y de *A. elegans* (80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}$)(figura 6).

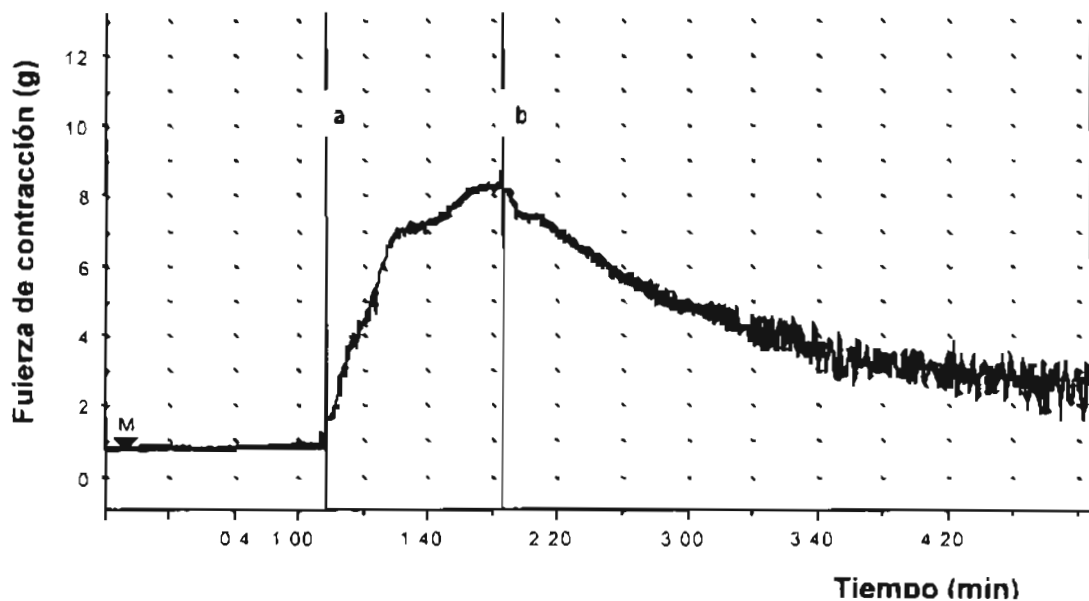


Figura 4. Registro de la contracción del íleon aislado de cobayo inducida con el veneno de *C. limpidus limpidus* {a} (14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y efecto sobre la respuesta contráctil del extracto hexánico (150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de *Aristolochia elegans* {b}.

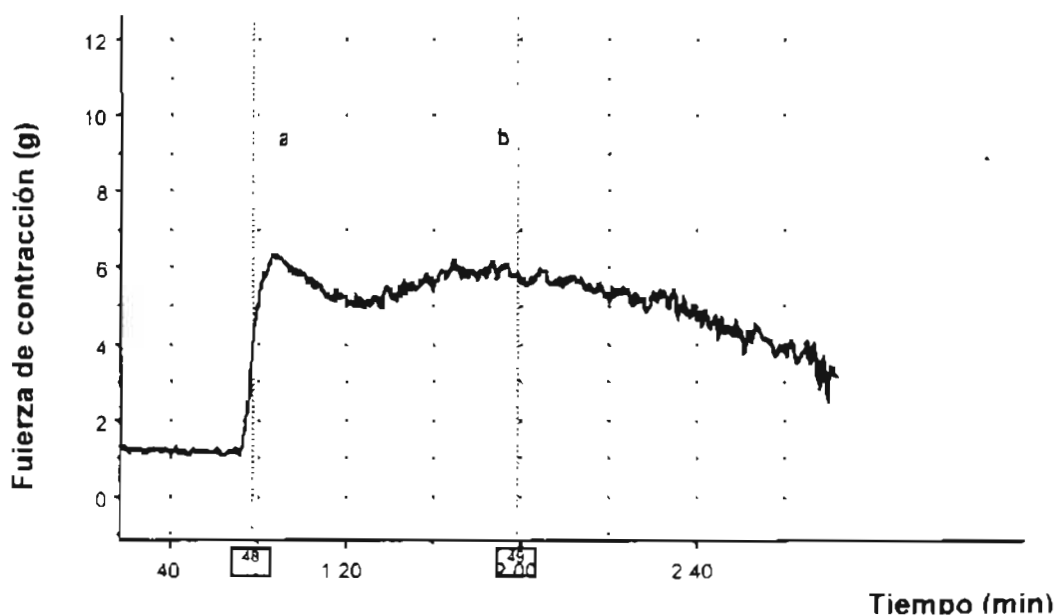


Figura 5. Registro de la contracción del íleon aislado de cobayo inducida por el veneno de *C. limpidus limpidus* {a} (14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y efecto sobre la respuesta contráctil del extracto hexánico (150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de *Bouvardia ternifolia* Schltdl {b}.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INVESTIGACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

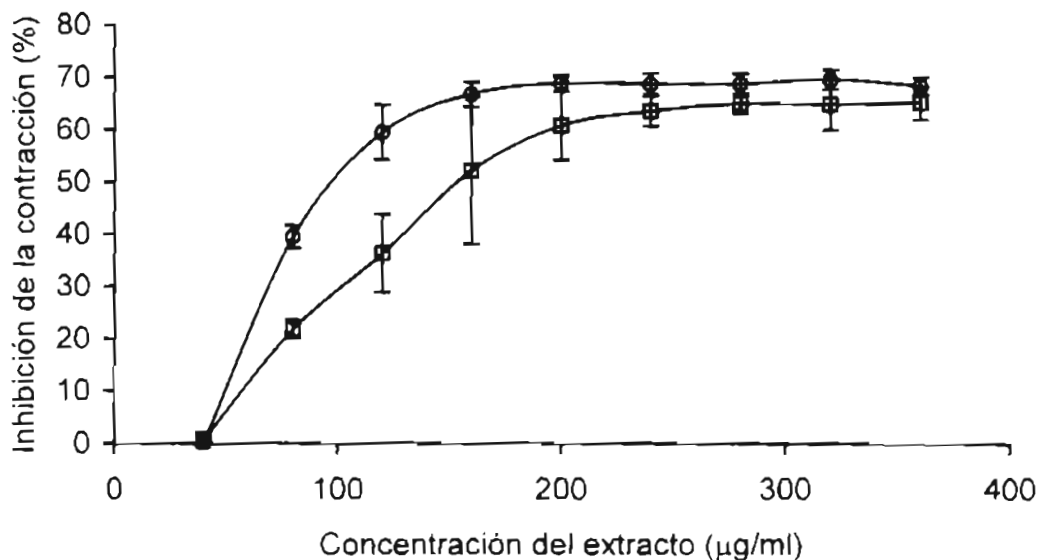


Figura 6. Inhibición producida por la adición de diferentes concentraciones de los extractos hexánicos de *Aristolochia elegans* (□) y *Bouvardia ternifolia* (○) sobre las contracciones inducidas por 14 μg/ml de veneno de *C. limpidus limpidus* en íleon aislado de cobayo. Cada punto es el promedio de 5 determinaciones $\pm$ D.E.

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

La administración de veneno en las aurículas aisladas de rata provocó un efecto inotrópico y cronotrópico positivo dependiente de la concentración. Cuando se administró el veneno la contracción alcanzó un efecto máximo de aproximadamente un 120% sobre la fuerza de contracción basal. La adición de los extractos hexánico y metanólico de *B. ternifolia* y *A. elegans* disminuyeron significativamente el efecto inotrópico positivo (figuras 7 y 9).

Respecto a la frecuencia de contracción, el veneno incrementó este parámetro de manera dependiente de la concentración, sin embargo, ninguno de los extractos mostró capacidad de disminuir significativamente el efecto cronotrópico positivo provocado por el veneno (figuras 8 y 10).

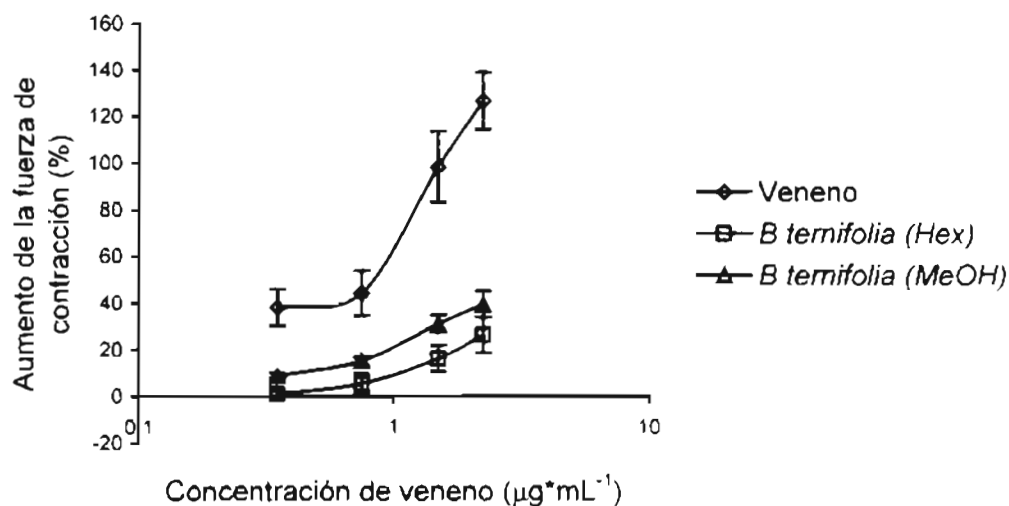


Figura 7. Efecto del extracto hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *Bouvardia ternifolia* sobre el efecto inotrópico positivo inducido por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la la contracción espontánea de aurículas aisladas de rata. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones $\pm$ D.E.

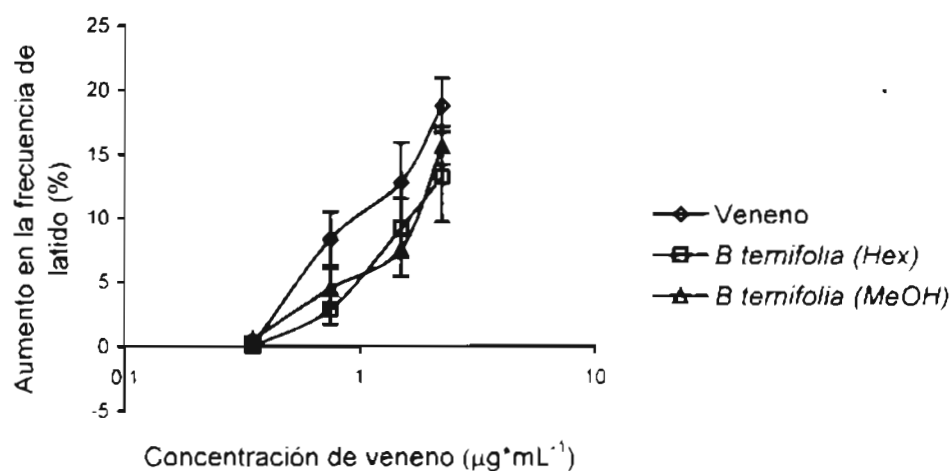


Figura 8. Efecto del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata (medido como porcentaje de aumento) y en presencia del extracto hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *Bouvardia ternifolia*. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones $\pm$ D.E.

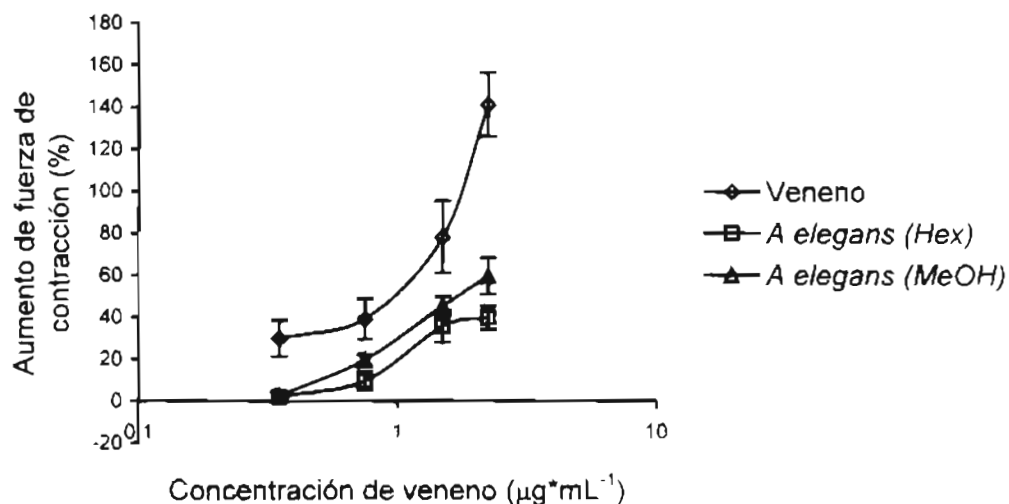


Figura 9. Efecto del extracto hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *Aristolochia elegans* sobre el efecto inotrópico positivo inducido por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la la contracción espontánea de aurículas aisladas de rata. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones $\pm$ D.E.

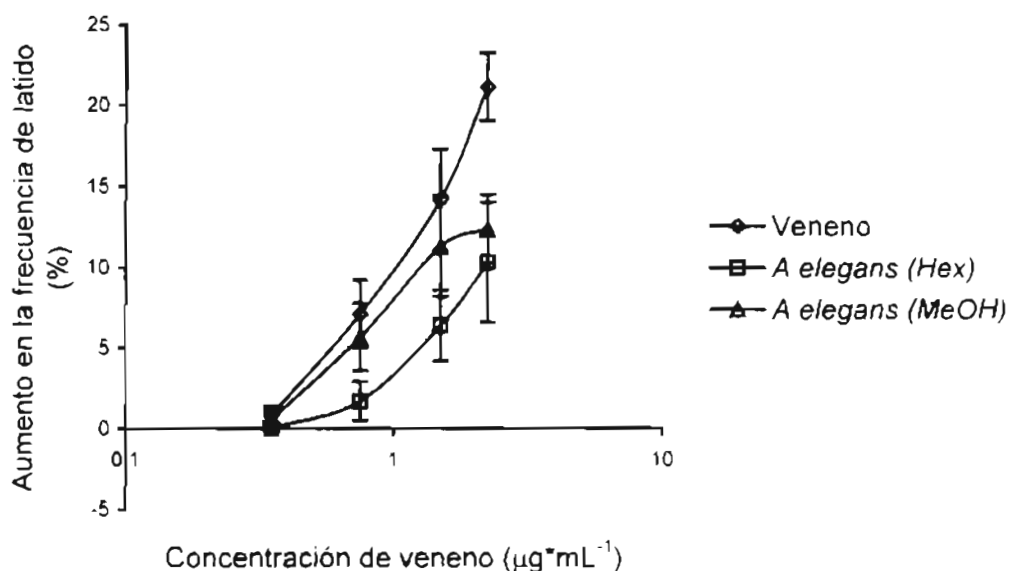


Figura 10. Efecto del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* sobre la frecuencia de contracción de aurículas aisladas de rata (medido como porcentaje de aumento) y en presencia del extracto hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *Aristolochia elegans*. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones $\pm$ D.E.

La adición del veneno a preparaciones con aurículas aisladas modificó el trazo del registro de manera evidente, tanto en la altura (fuerza de

contracción) como en la anchura del trazo (frecuencia). la adición de los extractos vegetales antagonizó el efecto del veneno. Las figuras 11 a 15, corresponden al trazo en tiempo real de las contracciones espontáneas de las aurículas y bajo el efecto del veneno y del extracto hexánico de *B. ternifolia*. En la figura 11 se muestra el registro de un experimento completo. el trazo indica el comportamiento basal, el detalle de la arquitectura del trazo se ilustra en la figura 12. Corresponde al periodo de medición de 0 – 46 segundos, tiene un promedio de fuerza de contracción de 0.436 ± 0.05 g y una frecuencia de contracción de 199.8 ± 3.1 latidos por minuto (LPM). En el trazo se observa regularidad tanto en la altura como en el ancho. asimismo, en la arquitectura del trazo.

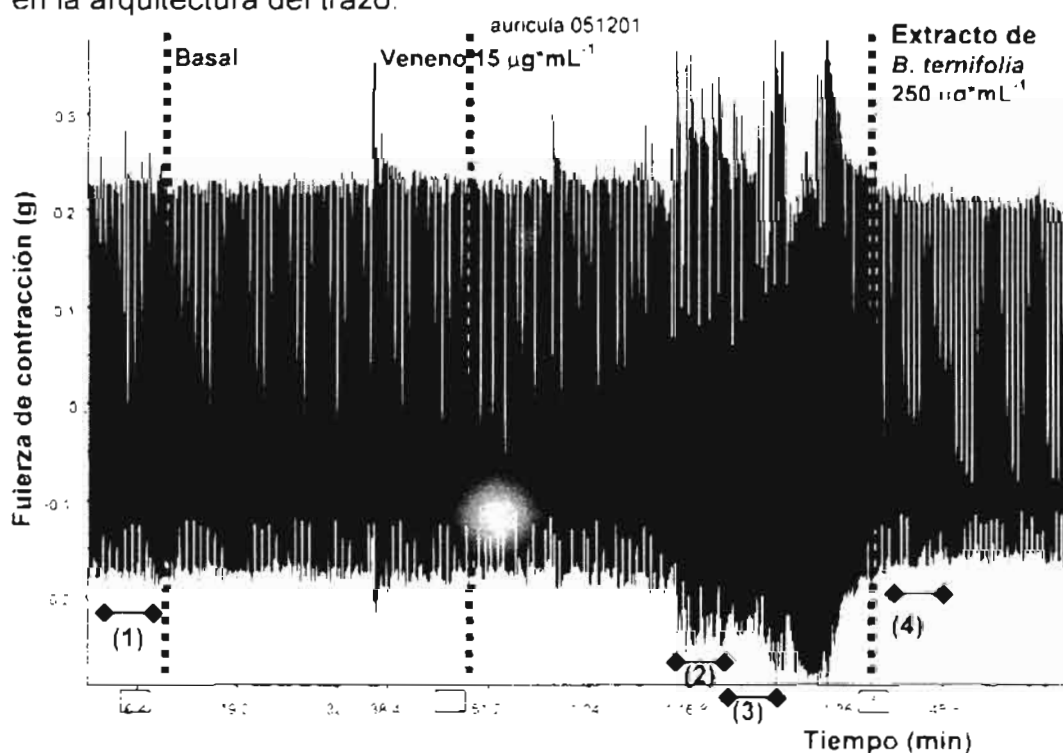


Figura 11. Registro que muestra el efecto producido por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (15 µg/ml) sobre la actividad contráctil de las aurículas aisladas de rata y la administración posterior del extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* (250 µg/ml). Los números 1, 2, 3 y 4, define los segmentos del registro se amplia en las figuras 12, 13, 14 y 15.

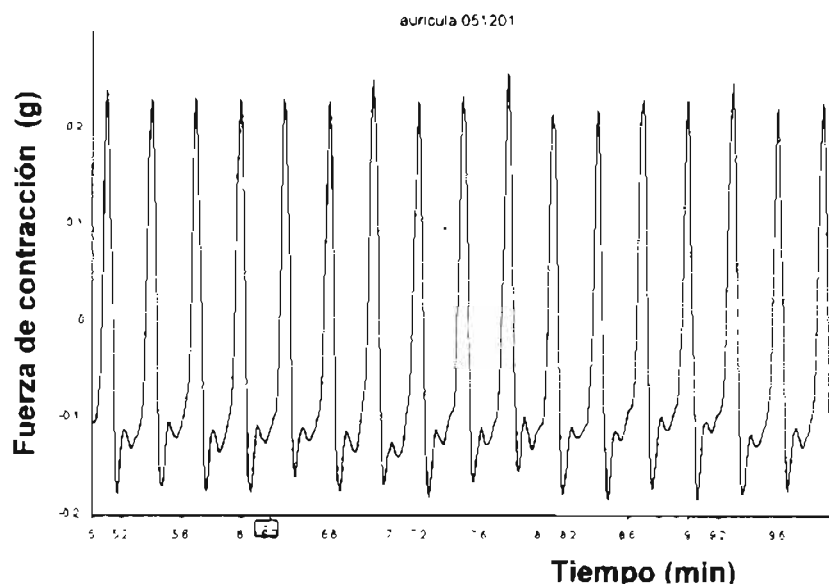


Figura 12. Detalle del registro del comportamiento basal (1 de la figura 11) de la la contracción de aurícula de rata. El promedio de la fuerza contracción fue $0.436 \text{ g} \pm 0.05$, la velocidad promedio $199.8 \pm 3.1 \text{ LPM}$. El período de medición fue de 0 – 46 segundos.

La adición del veneno ($15 \text{ } \mu\text{g/ml}$) en la preparación se muestra en la figura 11 y que corresponde a 48 seg. Sin embargo, el efecto se ve reflejado claramente hasta los 74 segundos. El promedio de la fuerza contracción fue $0.557 \pm 0.12 \text{ g}$. y la frecuencia $219.8 \pm 5.8 \text{ LMP}$, el periodo de medición fue de 48 a 95 seg. Las características del trazo basal se modifican con la aparición de espigas irregulares (figura 13) disminuye la altura y la amplitud, pero sobretudo se modifica la arquitectura. En la figura 14 se observa con detalle como el trazo se vuelve totalmente irregular, como consecuencia de la disminución de la anchura del trazo aumenta la frecuencia de contracción

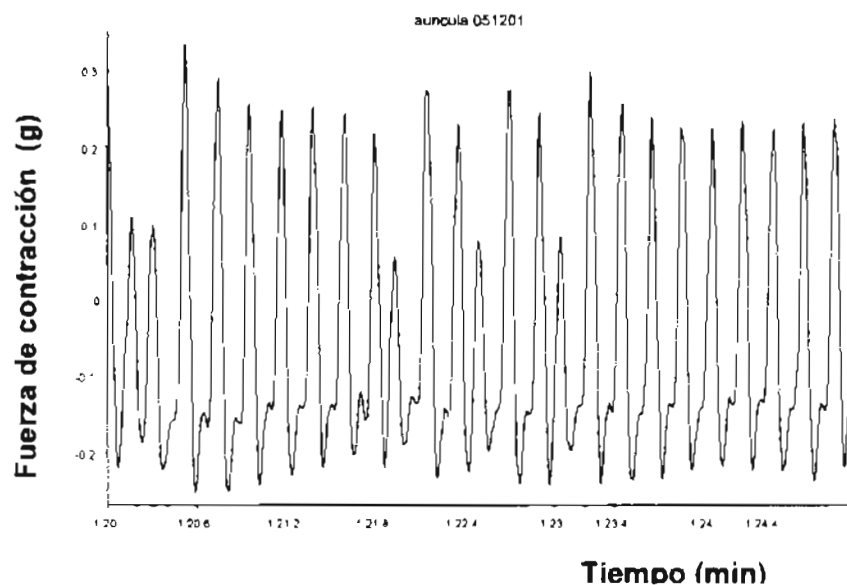


Figura 13. Detalle del registro del efecto del veneno ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (2 de la figura 11) sobre la contracción de la aurícula de rata. El promedio de contracción fue $0.557 \text{ g} \pm 0.12$. El periodo de medición fue de 48 – 95 segundos.

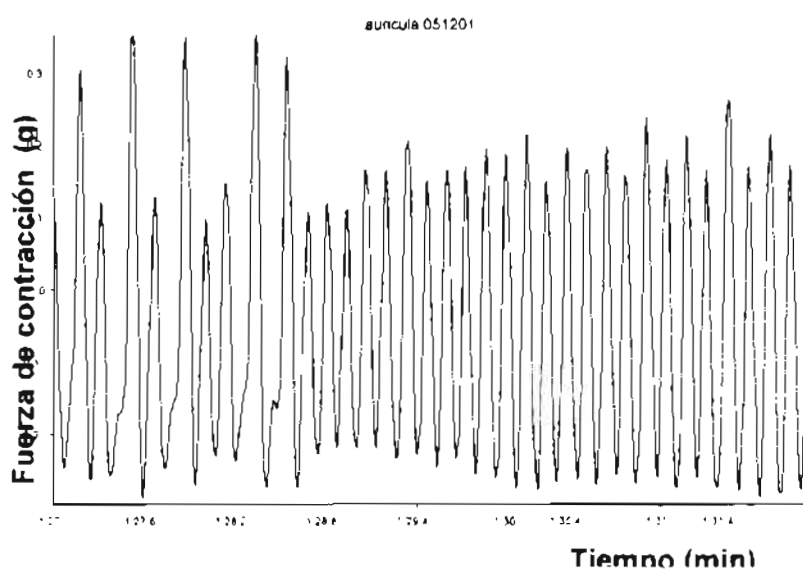


Figura 14. Detalle del registro del efecto del veneno ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (3 de la figura 11) sobre la contracción de aurícula de rata. El promedio de contracción fue $0.557 \text{ g} \pm 0.12$. El periodo de medición fue de 48 – 95 segundos.

La adición de los extractos vegetales y en este caso particular, el extracto hexánico de *B. ternifolia* ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), restableció la regularidad de las contracciones de las aurículas. El detalle del trazo se observa en la figura 15, el promedio de la fuerza de contracción fue $0.388 \pm 0.06 \text{ g}$ y la frecuencia $195 \pm 2.8 \text{ LPM}$, indicando una recuperación del tejido. El periodo de medición fue de 100 - 124 seg. Se observa también que se restablece la arquitectura del trazo.

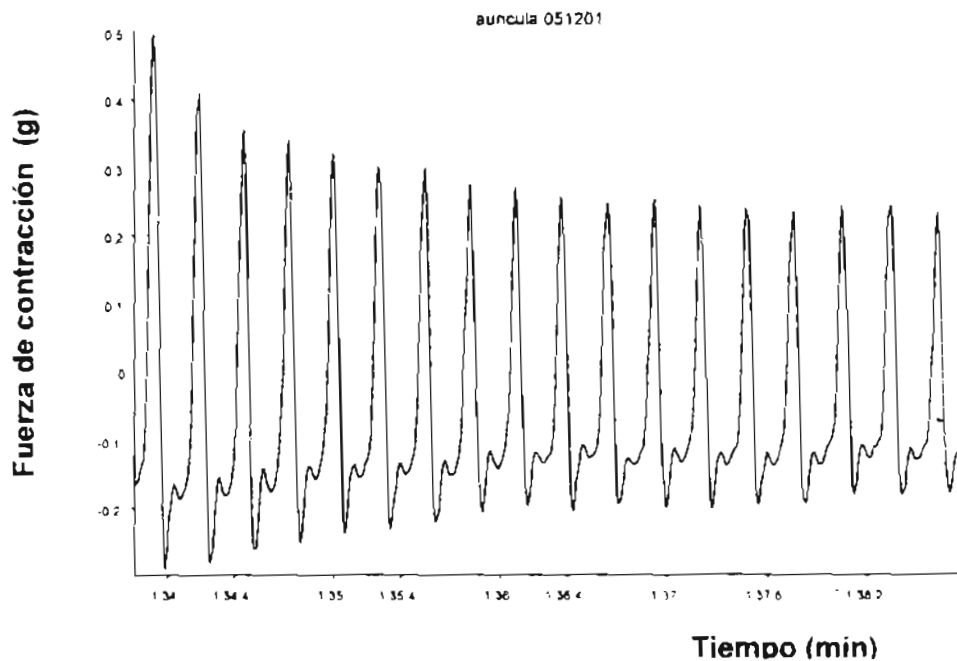


Figura 15. Detalle del registro del efecto del extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (4 de la figura 11) adicionado en el segundo 100, midiendo la contracción de aurícula de rata. El promedio de la contracción fue $0.388 \text{ g} \pm 0.06$. El periodo de medición fue de 100 - 124 segundos.

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

El veneno de *Centruroides limpidus limpidus* provocó liberación de amilasa, en forma dependiente de la concentración, en el páncreas aislado de ratón. En este ensayo también se observó que existe una dependencia del tiempo de exposición del tejido al veneno. Los efectos máximos (E_{max}) calculados fueron 537.6, 628.9 y 769.2 UA·L⁻¹ para los 5, 10 y 20 min de incubación del páncreas en presencia de veneno.

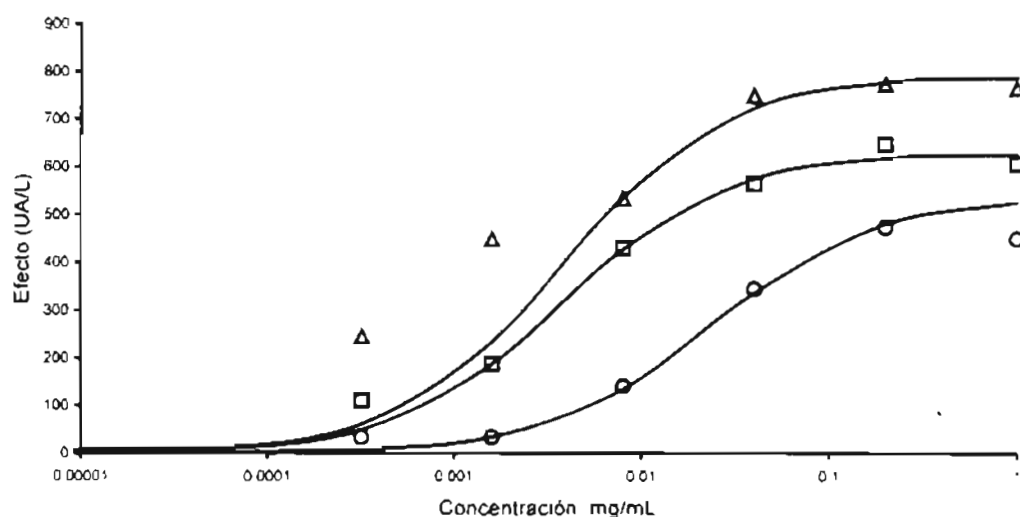


Figura 16. Curvas concentración-respuesta de la liberación de amilasa en el páncreas aislado de ratón expuesto a concentraciones crecientes de veneno. Exposición al veneno en diferentes tiempos 5, 10 y 20 minutos (○, ◻ y △). Las CE_{50} calculadas son: 0.023, 0.00376 y 0.0038 mg/mL respectivamente y los E_{max} calculados son 537.6, 628.9 y 769.2 UA·L⁻¹ en el mismo orden.

Las CE_{50} calculadas fueron: 0.023, 0.00376 y 0.0038 mg·mL⁻¹ en el mismo orden, lo que permitió definir que el tiempo de exposición de 10 min

tiene el mismo efecto que a tiempos mayores. En la figura 16 se muestran las curvas de concentración-respuesta, relacionadas con la cantidad de amilasa liberada en presencia de concentraciones crecientes del veneno.

Conforme el tiempo de incubación del páncreas es mayor aumenta la cantidad de amilasa liberada. Tomando como referencia los 10 min de incubación, se observó que las concentraciones de 0.04, 0.2 y 1 mg·mL⁻¹, presentan un efecto similar y a los 20 minutos los valores de liberación de amilasa se aproximan hasta alcanzar prácticamente el mismo valor (figura 17). Con estos datos se establecieron las condiciones del ensayo para la determinación de la contención de la descarga pancreática por los extractos vegetales, provocada por el veneno de alacrán.

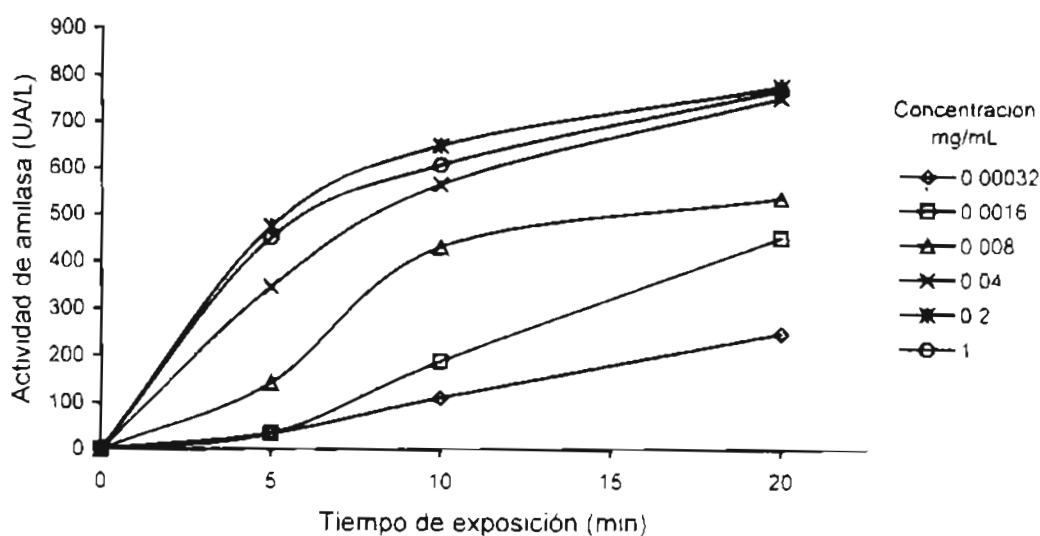


Figura 17. Velocidad de liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, expuesto a diferentes tiempos: 5, 10 y 20 minutos.

Debido a que la actividad de la enzima se utilizó para evaluar el efecto farmacológico sobre la actividad hidrolítica de la amilasa, fué otro de los

parámetros valorados de los compuestos vegetales sobre la capacidad secretagoga del veneno.

Al realizar la cinética enzimática del almidón en presencia de los extractos hexánicos y metanólicos de ambas plantas, se observó que los extractos de *B. ternifolia* inhiben la actividad hidrolítica de la amilasa, por lo que se determinaron las constantes cinéticas e inhibitorias. La relación de la velocidad respecto a la concentración de almidón muestra un comportamiento del tipo de cinética de Michaelis-Menten (figura 18).

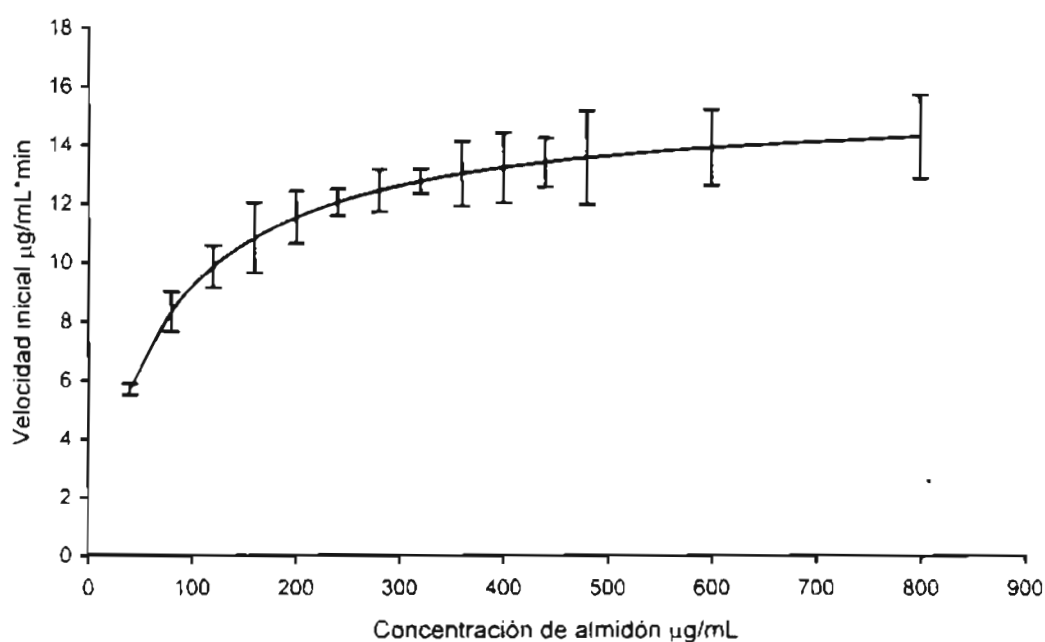


Figura 18. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, determinada bajo condiciones de laboratorio estipuladas en la metodología. La curva obtenida es el promedio de 3 determinaciones.

A partir de la transformación de Lineweaver-Burk, mostrada en la gráfica de la figura 16, se calcularon las constantes cinéticas en las

condiciones del laboratorio, con valores de $K_M = 68.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $V_{\max} = 15.47 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$.

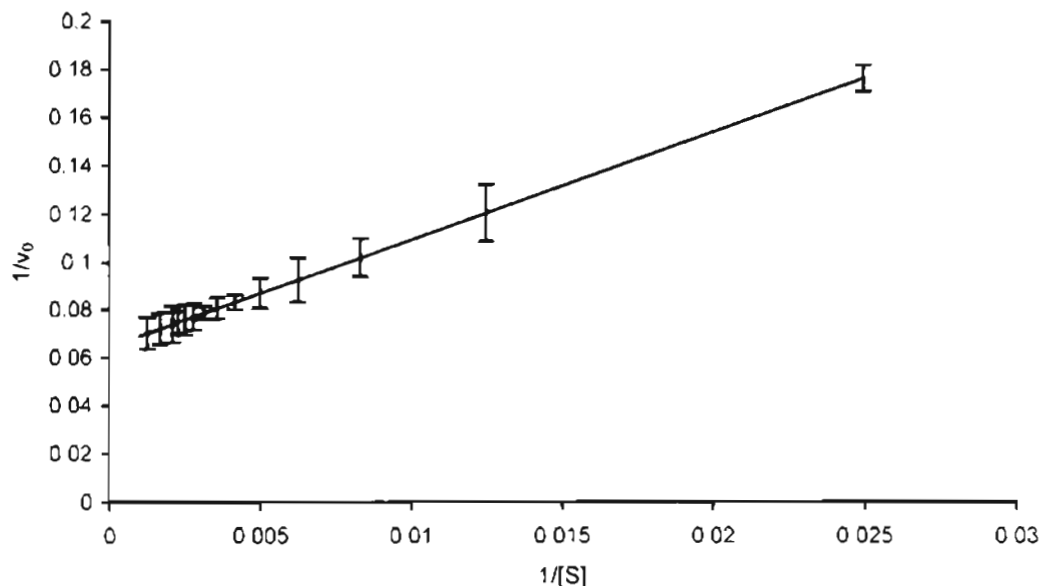


Figura 19. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) para la determinación de las constantes cinéticas de la amilasa pancreática. La línea continua es el ajuste a la recta del promedio de tres determinaciones ($K_M = 68.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $V_{\max} = 15.47 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$).

La determinación de la cinética enzimática en presencia del extracto hexánico de *B. ternifolia* mostró una disminución de la velocidad máxima (figura 20). La transformación de Lineweaver-Burk permitió calcular $K_{Mapp} = 73.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $V_{\max} = 8.025 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ (figura 21)

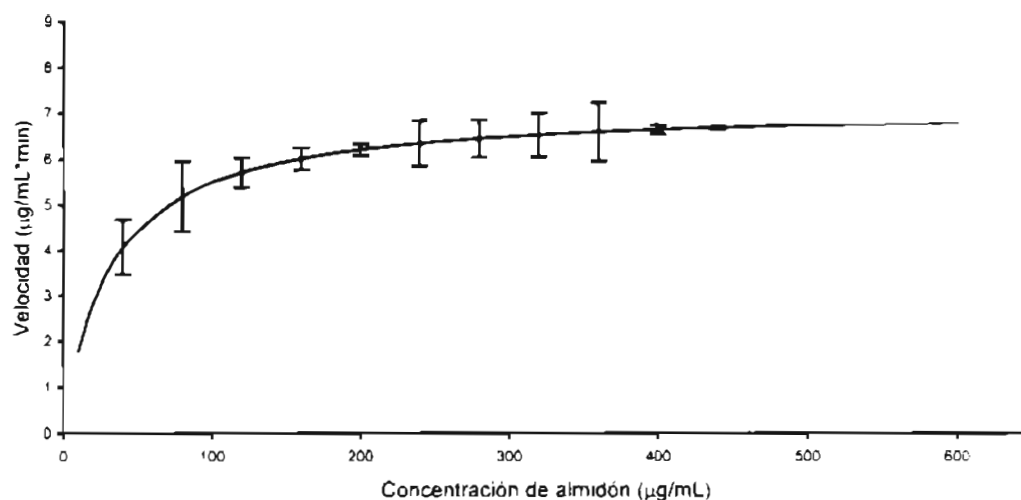


Figura 20. Cinética enzimática de amilasa pancreática de ratón, en presencia del extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia*. La curva obtenida es el promedio de 3 determinaciones.

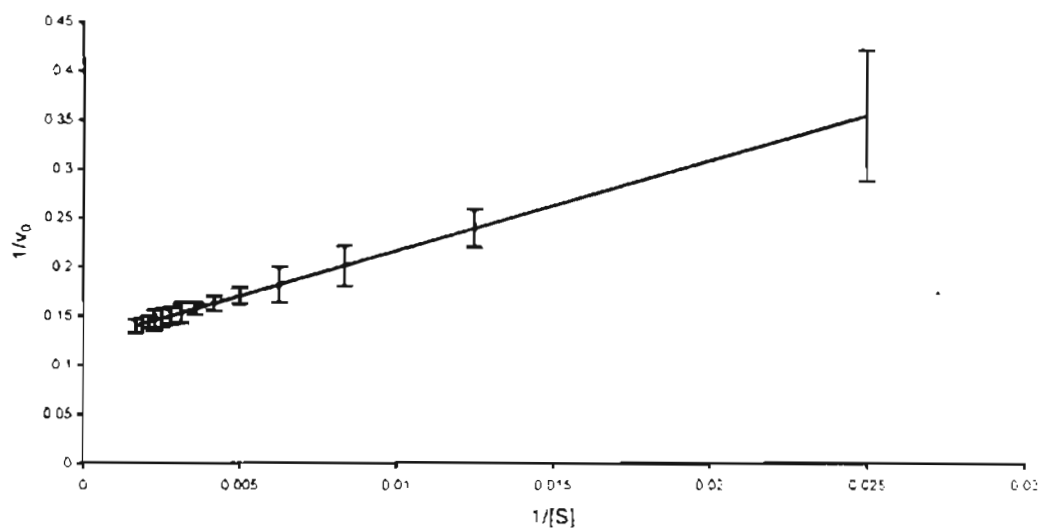


Figura 21. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) de la cinética de amilasa en presencia de extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia*. La línea continua es el ajuste a la recta del promedio de tres determinaciones ($K_{Mapp} = 73.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $V_{\max i} = 8.025 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$).

Respecto al comportamiento cinético de la amilasa en presencia del extracto metanólico de *B. ternifolia*, también se encontró una disminución de la velocidad máxima (figura 22).

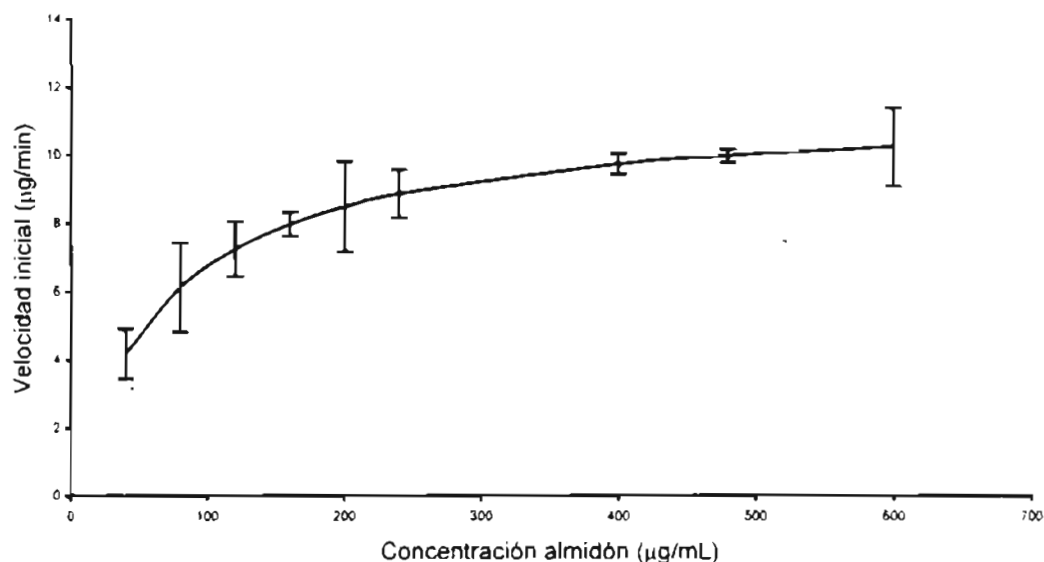


Figura 22. Cinética enzimática de la amilasa pancreática de ratón en presencia del extracto metanólico de *Bouvardia ternifolia*. La curva obtenida es el promedio de 3 determinaciones.

Con la transformación de dobles recíprocas se calculó $K_M = 68.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $V_{\text{max}} = 11.39 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ (figura 23). Al representar en una sola gráfica el comportamiento de las tres rectas, figura 24, se observa que el extracto metanólico se comporta como inhibidor acompetitivo, mientras que el extracto hexánico se comporta como un inhibidor no competitivo.

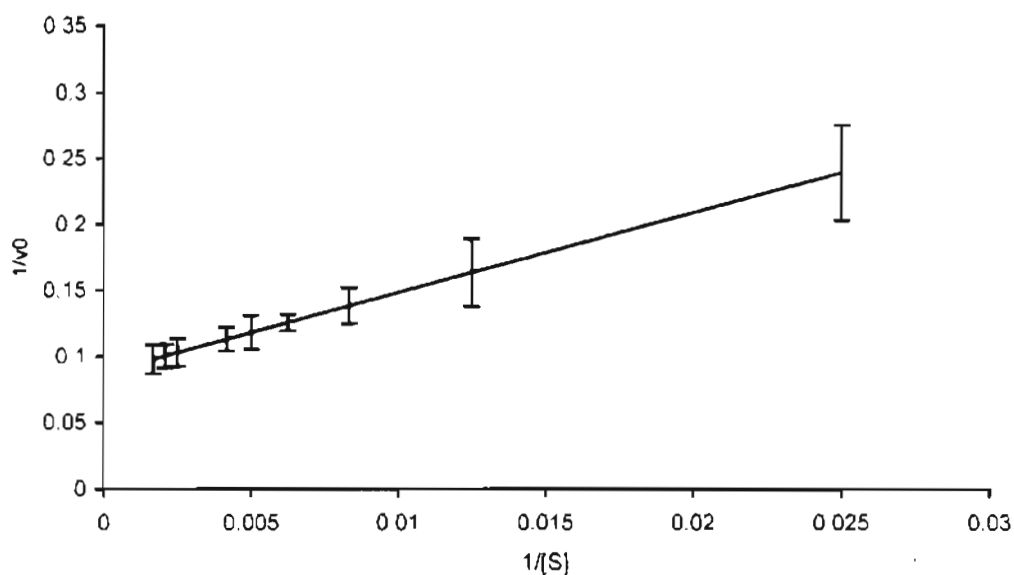


Figura 23. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) de la cinética de amilasa en presencia de extracto metanólico de *Bouvardia ternifolia*. La línea continua es el ajuste a la recta del promedio de tres determinaciones ($K_M = 68.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $V_{\max} = 11.39 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$).

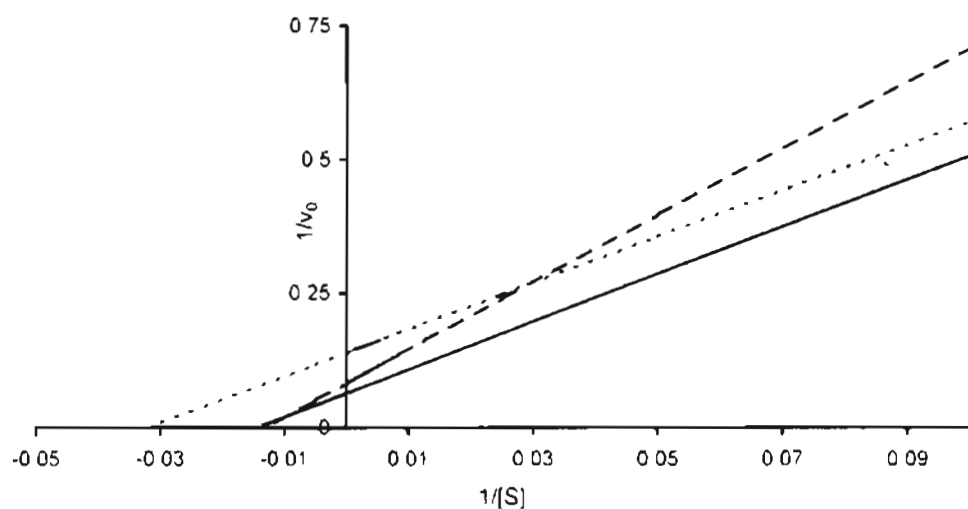


Figura 24. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) de la cinética de amilasa en presencia del extracto hexánico (1), extracto metanólico (2) de *Bouvardia ternifolia* comparado y sin extractos (3). En presencia del extracto metanólico y hexánico hay 53.88% y 29.26% de inhibición de amilasa.

El efecto secretagogo del veneno, fue antagonizado por los extractos vegetales. En el caso de *B. ternifolia* se determinó que la CE_{50} del veneno aumentó de $0.000376 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0.000913 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en presencia del extracto metanólico y con el extracto hexánico se incrementó a $0.01629 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (figura 25).

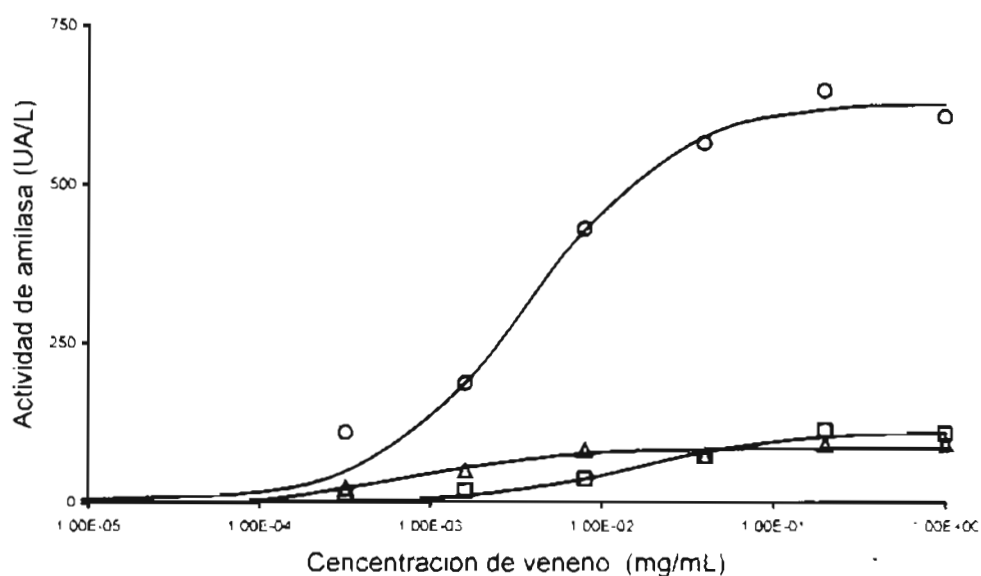


Figura 25. Efecto de los extractos hexánico (◻) y metanólico (Δ) de *Bouvardia ternifolia* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón. Las CE_{50} del veneno solo (○) es: $0.000376 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; en presencia de extracto metanólico y hexánico los valores de CE_{50} son: 0.01629 y $0.00913 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente y E_{max} 109.34 y $84.64 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ en el mismo orden.

Sin embargo, considerando las constantes inhibitorias de los extractos sobre la amilasa (figuras 20 y 22), calculadas como $K_i = 0.0868$ y 0.03284 para el extracto hexánico y metanólico respectivamente, se debió ajustar el valor de

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

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

	K_M ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	V_{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	K_i	%I	CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	E_{max}	ΔE_{max}	Efecto i	Efecto neto
Bt _{MeOH}	68.75	11.39	0.0328	9.45	9.13×10^{-5}	84.64	541.76	51.19	490.5
Bt _{Hex}	73.61	8.025	0.0868	36.45	0.01629	109.34	517.06	188.46	328.6
Veneno					3.76×10^{-3}	626.4			
Amilasa	68.56	13.47							

Los extractos hexánico y metanólico de *A. elegans* mostraron capacidad para disminuir la liberación de amilasa en el páncreas aislado de ratón; sin embargo, a diferencia de los extractos de *B. ternifolia* no se observó inhibición de la enzima. Como se muestra en la figura 26, la CE_{50} del veneno solo sin extracto fue de 0.000376 mg·mL⁻¹. Con el extracto

metanólico y hexánico los valores CE_{50} fueron: 0.0022 y 0.0109 $mg \cdot mL^{-1}$, respectivamente y los E_{max} fueron 113 y 221 $UA \cdot L^{-1}$ en el mismo orden.

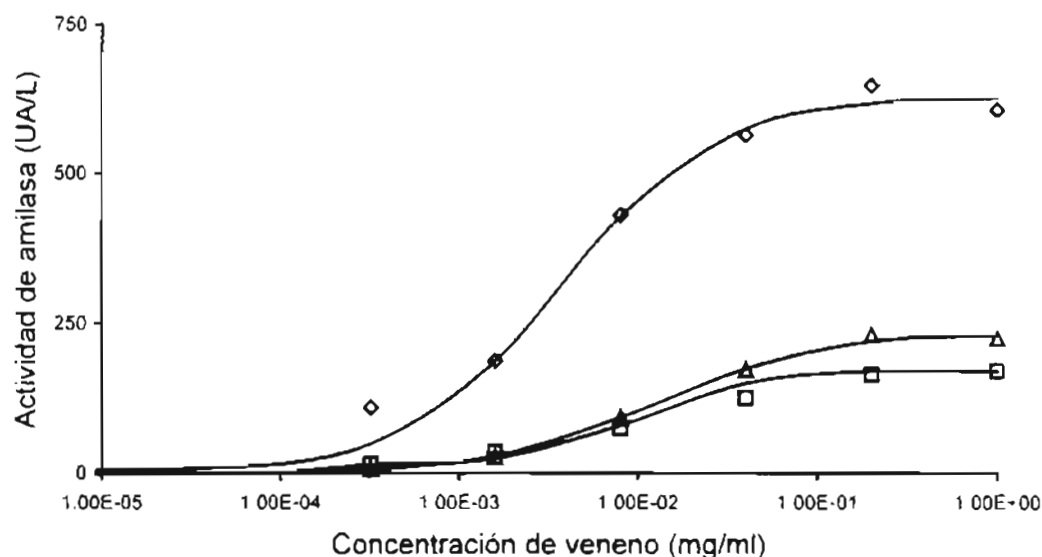


Figura 26. Se muestra el efecto de los extractos hexánico (□) y metanólico (△) de *Aristolochia elegans* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón. Las CE_{50} del veneno solo (◇) es: 0.000376 $mg \cdot mL^{-1}$, en presencia de extracto metanólico y hexánico los valores de CE_{50} son: 0.0022 y 0.0109 $mg \cdot mL^{-1}$ respectivamente y los E_{max} son 113 y 221 $UA \cdot L^{-1}$ en el mismo orden.

Se realizó la determinación de la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón provocada por la adición de carbamilcolina, donde a diferentes tiempos de incubación se establecieron las CE_{50} en: 0.00015, 0.00019 y 0.0018 $mg \cdot mL^{-1}$ a los tiempos de incubación de 5, 10 y 20 min (figura 27).

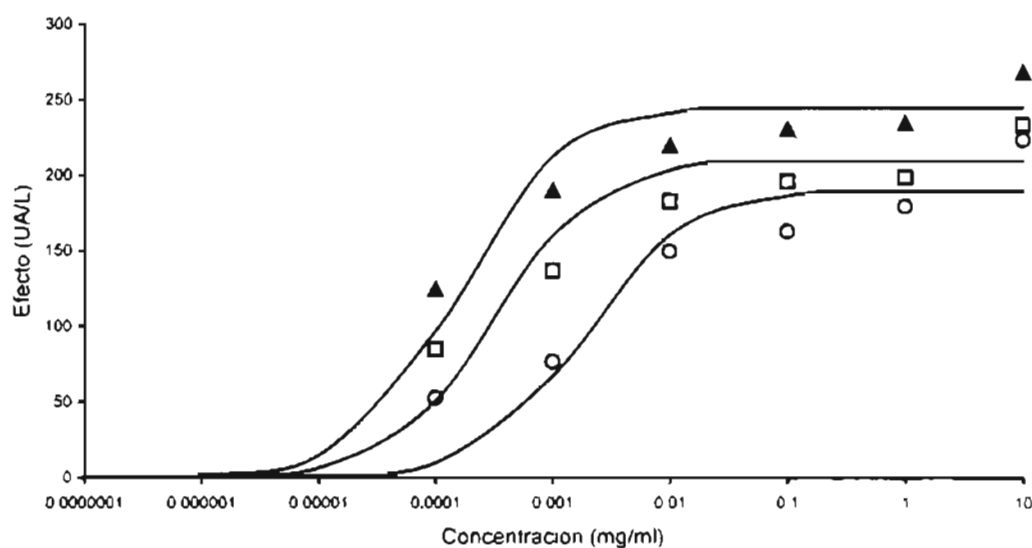


Figura 27. Curva de concentración-respuesta de liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón, expuesto a concentraciones crecientes de carbamilcolina. La exposición al agonista en diferentes tiempos 5, 10 y 20 minutos (▲, ◻ y ○). Las CE_{50} calculadas son: 0.00015, 0.00019 y 0.0018 $mg \cdot mL^{-1}$ en el mismo orden.

Posteriormente se realizó la determinación del efecto de los extractos sobre la actividad secretagoga de carbamilcolina. La figura 28 muestra el efecto antagónico de los extractos metanólico y hexánico de *B. ternifolia* y se el aumento de CE_{50} de 0.00015 $mg \cdot mL^{-1}$ a 0.006 y 0.05 $mg \cdot mL^{-1}$ respectivamente. Respecto a E_{max} se estableció una disminución de 245 $UA \cdot L^{-1}$ a 140 y 160 $UA \cdot L^{-1}$ en el mismo orden.

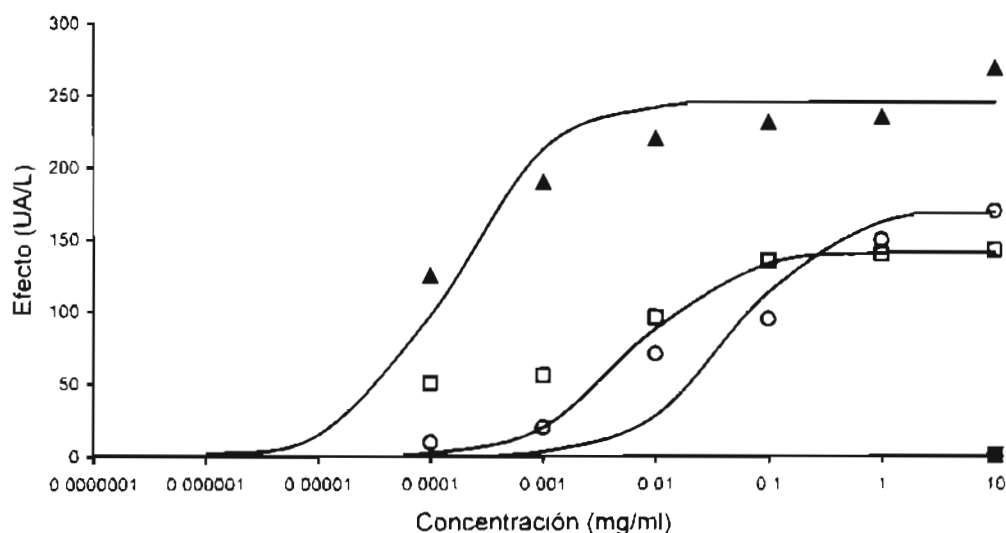


Figura 28. Se muestra el efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Bouvardia ternifolia* sobre la liberación de amilasa en páncreas aislado de ratón estimulado con carbamilcolina. Las CE_{50} y E_{max} (▲) de la carbamilcolina son: $0.00015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $245 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$; en presencia de extracto metanólico (□) y hexánico (○) los valores de CE_{50} y E_{max} son: $0.006 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $140 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $160 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente.

De manera similar se determinó la capacidad de los extractos metanólico y hexánico de *A. elegans* (figura 29), sobre la contención de la descarga pancreática provocada por carbamilcolina. Fijando un aumento de la CE_{50} de $0.00015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 0.004 y $0.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente, el E_{max} estableció una disminución de $245 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$ a 190 y $175 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$ en el mismo orden.

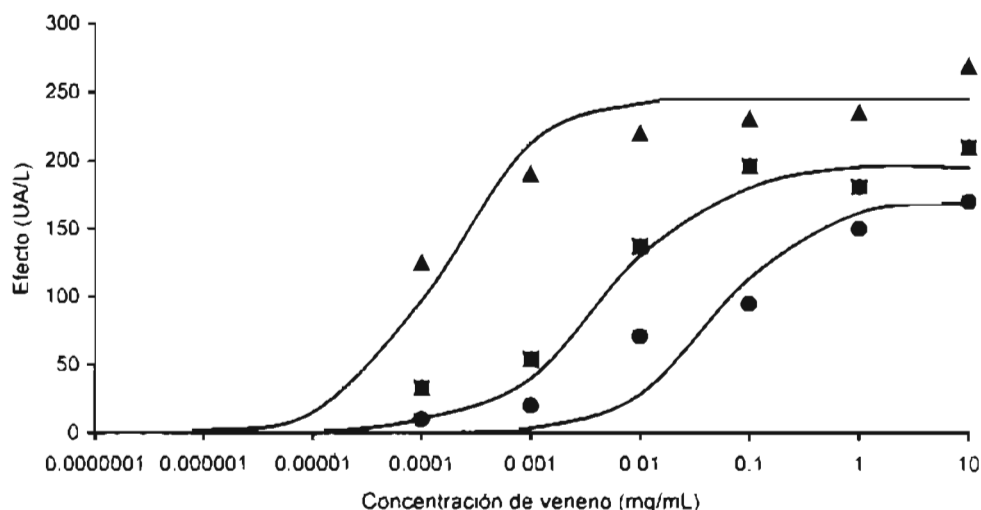


Figura 29. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* sobre la liberación de la amilasa en páncreas aislado de ratón estimulado con carbamilo colina. Las CE_{50} y E_{max} (▲) de la carbamilo colina son: $0.00015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $245 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$; en presencia de extracto metanólico (■) y hexánico (●) los valores de CE_{50} y E_{max} son: $0.004 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $190 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $175 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente

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

a). Comparación de la secuencias de aminoácidos de la amilasa de ratón y de origen porcino.

En el anterior ensayo se determinó la capacidad inhibitoria de los extractos de *B. ternifolia* sobre la liberación de amilasa pancreática. Por otro lado, la actividad enzimática se utilizó como parámetro del antagonismo de los extractos sobre la capacidad secretagoga del veneno de *C. limpidus limpidus*, por lo tanto, para corroborar este efecto se midió la amilasa pancreática a través de un anticuerpo específico antiamilasa, por medio del ensayo inmunoenzimático ELISA. Dado que la amilasa pancreática que se utilizó como inmunógeno fue de origen porcino, se realizó una comparación

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

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

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

=====

59

1HX0A158CM	MCGSGAAAGTGTTCGSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY	150
10SE2098CM	MCGSGAAAGTGTTCGSYCNPGSREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY	150
AAF02828CM	MCGSGAAAGTGTTCGSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY	150
1PIF1942CM	MCGSGAAAGTGTTCGSYCNPGSREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY	150
ALPGP673CM	MCGSGAAAGTGTTCGSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESY	150
AAA37221RM	MCGVGAQAGQSSTCGSYFNPNNRDFPGVPYSGDFDNDGKCRASGGIENY	150
CAA24100RM	MCGVGAQAGQSSTCGSYFNPNNRDFPGVPYSGDFDNDGKCRASGGIENY	150
CAA24099RM	MCGVGAQAGQSSTCGSYFNPNNRDFPGVPYSGDFDNDGKCRASGGIENY	150
AAA37230RM	MCGAGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEIDNY	147
CAA24098RM	MCGAGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEIDNY	147
NP033799RM	MCGAGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEIDNY	147
CAA26413RM	MCGSGNPAGTSSTCGSYLNPNNREFPAVPYSAWDFNDNKC---NGEISNY	147
	*** **	
1HX0A158CM	NDPYQVRDCQLVGLLDLAL EKDYVR SMIADYLNKLIDIGVAGFRIDASKH	200
10SE2098CM	NDPYQVRDCQLVGLLDLAL EKDYVR SMIADYLNKLIDIGVAGFRIDASKH	200
AAF02828CM	NDPYQVRDCQLVGLLDLAL EKDYVR SMIADYLNKLIDIGVAGFRIDASKH	200
1PIF1942CM	NDPYQVRDCQLVGLLDLAL EKDYVR SMIADYLNKLIDIGVAGFRIDASKH	200
ALPGP673CM	NDPYQVRDCQLVGLLDLAL EKDYVR SMIADYLNKLIDIGVAGFRIDASKH	200
AAA37221RM	QDAAQVRDCRLSGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDASKH	200
CAA24100RM	QDAAQVRDCRLSGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDASKH	200
CAA24099RM	QDAAQVRDCRLSGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDASKH	200
AAA37230RM	NDAYQVRNCRLTGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH	197
CAA24098RM	NDAYQVRNCRLTGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH	197
NP033799RM	NDAYQVRNCRLTGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH	197
CAA26413RM	NDAYQVRNCRLSGLLDLAL EKDYVR TKVADYMNHLIDIGVAGFRIDAAKH	197
	*** **	
1HX0A158CM	MWPGDIKAVLDKLHNLNTNWFPA ~~GS~~ RPPIFQEVIDLGGEAIKSSEYFGNG	250
10SE2098CM	MWPGDIKAVLDKLHNLNTNWFPA ~~GS~~ RPPIFQEVIDLGGEAIQSSEYFGNG	250
AAF02828CM	MWPGDIKAVLDKLHNLNTNWFPA ~~GS~~ RPPIFQEVIDLGGEAIQSSEYFGNG	250
1PIF1942CM	MWPGDIKAVLDKLHNLNTNWFPA ~~GS~~ RPPIFQEVIDLGGEAISSEYFGNG	250
ALPGP673CM	MWPGDIKAVLDKLHNLNTNWFPA ~~GS~~ RPPIFQEVIDLGGEAIKSSEYFGNG	250
AAA37221RM	MWPGDIKAILDKLHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAVSSNEYFGNG	250
CAA24100RM	MWPGDIKAILDKQHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAVSSNEYFGNG	250
CAA24099RM	MWPGDIKAILDKQHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAVSSNEYFGNG	250
AAA37230RM	MWPRDIKAVLDKLHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAIKGSEYFGNG	247
CAA24098RM	MWPRDIKAVLDKLHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAIKGSEYFGNG	247
NP033799RM	MWPRDIKAVLDKLHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAIKGSEYFGNG	247
CAA26413RM	MWPRDIKAVLDKLHNLNTKWF ~~SQ~~ SRPPIFQEVIDLGGEAIKGSEYFGNG	247
	*** **	
1HX0A158CM	RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
10SE2098CM	RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
AAF02828CM	RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
1PIF1942CM	RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
ALPGP673CM	RVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
AAA37221RM	RVTEFKYGAKLGKVMRKWDGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
CAA24100RM	RVTEFKYGAKLGKVMRKWDGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
CAA24099RM	RVTEFKYGAKLGKVMRKWDGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	300
AAA37230RM	RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	297
CAA24098RM	RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	297
NP033799RM	RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	297
CAA26413RM	RVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGE ~~GW~~ FMPSDRALVFVDNHDN	297

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

1HX0A158CM	NGEDVNDWIGPPNNNGVIKEVTINADTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN	398
10SE2098CM	NGEDVNDWIGPPNNNGVIKEVTINADTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN	398
AAF02828CM	NGQDVNDWIGPPNNNGVIKEVTINADTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVWFRN	398
1PIF1942CM	NGEDVNDWIGPPNNNGVIKEVTINADTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN	398
ALPGP673CM	NGEDVNDWIGPPNNNGVIKEVTINADTTCGNDWVCEHRWREIRNMVWFRN	398
AAA37221RM	NGKDVDNDWVGPPNNNGKTKEVSINPDSTCGNDWICEHRWRQIRNMVAFRN	398
CAA24100RM	NGKDVDNDWVGPPNNNGKTKEVSINPDSTCGNDWICEHRWRQIRNMVAFRN	398
CAA24099RM	NGKDVDNDWVGPPNNNGKTKEVSINPDSTCGNDWICEHRWRQIRNMVAFRN	398
AAA37230RM	NGKDQNDWIGPPNNNGVTKEVTINADTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN	395
CAA24098RM	NGKDQNDWIGPPNNNGVTKEVTINADTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN	395
NP033799RM	NGKDQNDWIGPPNNNGVTKEWTINADTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN	395
CAA26413RM	NGKDQNDWIGPPNNNGVTKEVTINADTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRN	395

1HX0A158CM	VVDGQPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWQLSSTLOTGLPGGT	448
1OSE2098CM	VVDGEPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWQLSSTLOTGLPGGT	448
AAF02828CM	VVDGQPFANWWANGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWQLSSTLOTGLPGGT	448
1PIF1942CM	VVDGQPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWQLSSTLOTGLPGGT	448
ALPGP673CM	VVDGEPFANWWDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWQLSSTLOTGLPAGT	448
AAA37221RM	VVNGQPFANWWDNDSNQVAFGRGNKGLIVFNDDWALSETLOTGLPAGT	448
CAA24100RM	VVNGQPFANWWDNDSNQVAFGRGNKGLIVFNDDWALSETLOTGLPAGT	448
CAA24099RM	VVNGQPFANWWDNDSNQVAFGRGNKGLIVFNDDWALSETLOTGLPAGT	448
AAA37230RM	VVNGQPFNSNWDNNSNQVAFSRGNRGFIVFNDDWALSATLOTGLPAGT	445
CAA24088RM	VVNGQPFNSNWDNNSNQVAFSRGNRGFIVFNDDWALSATLOTGLPAGT	445
NP033799RM	VVNGQPFNSNWDNNSNQVAFSRGNRGFIVFNDDWALSATLOTGLPAGT	445
CAA26413RM	VVNGQPFNSNWDNNSNOVAFSRGNRGFIVFNDDWALSATLOTGLPAGT	445

1HX0A158CM	CDVISGDKVGNSTGKIKVYVSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL	495
10SE2098CM	CDVISGDKVGNSTGKIKVYVSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL	495
AAF02828CM	CDVISGDKVGNSTGKIKVYVSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL	495
1PIF1942CM	CNVISGDKVGNSTGKIPYVSSDGTAFQFSISNSAQDPFIAIHAESKL	495
ALPGP673CM	CDVISGDKVGNSTGKIKVYVSSDGTAFQFSISNSAEDPFIAIHAESKL	495
AAA37221RM	CDVISGDKVDGNCTGKIKVYVGNDSGKAHFSISNSAADPFIAIHAESKI	495
CAA24100RM	CDVISGDKVDGNCTGKIKVYVGNDSGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKI	495
CAA24099RM	CDVISGDKVDGNCTGKIKVYVGNDSGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKI	495
AAA37230RM	CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL	492
CAA24098RM	CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL	492
NF033799RM	CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL	492
CAA26413RM	CDVISGDKVDGNCTGLRVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL	492

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

13-MAY-

2002=====PC/GENE

* PREDICTION OF ANTIGENIC DETERMINANTS *

Done on sequence 1HX0A158CM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence 10SE2098CM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence 1PIF1942CM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence AAF02828CM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence ALPGP673CM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Las próximas secuencias son de amilasa pancreática de ratón.

Done on sequence AAA37221RM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence AAA37230RM.

Total number of residues is: 492.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Done on sequence CAA24100RM.

Total number of residues is: 495.

Analysis done on the complete sequence.

The method used is that of Hopp and Woods.

The averaging group length is: 6 amino acids.

-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

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

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

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

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

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

The three highest points of hydrophilicity are:

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

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Al analizar las seis secuencias de amilasa porcina reportadas (ALPGP673CM, 1HX0A158CM, 10SE2098CM, 1PIF1942CM, AAF02828CM, ALPGP673CM) [Payan 1980; Pasero 1986; Damis 1999; Qian 1993; Qian 1994; Qian 1995; Gilles 1996; Larson 1994; Wiegand 1995; Machius 1996] se observó que presentan los mismos determinantes antigénicos establecidos en todos los casos. Un primer fragmento con el mayor índice de hidrofilicidad es el que corresponde a la secuencia: Glu-Asn-Glu-Phe-Arg-

Asp, con un valor de $A_h = 1.62$ y su ubicación está dentro de la secuencia de aminoácidos de la amilasa pancreática porcina, es del aminoácido 75 al 80. En segundo término, con el mismo valor de hidrofiliidad de $A_h = 1.37$ se encuentran dos segmentos, el que corresponde a los aminoácidos que van del 136 al 141, con la secuencia Asn-Asp-Gly-Lys-Cys-Lys, y el fragmento comprendido entre el aminoácido 170 a 175 con la secuencia Glu-Lys-Asp-Tyr-Val-Arg. En el análisis de las secuencias de aminoácidos de la amilasa pancreática de ratón (AAA37221RM, AAA37230RM, CAA24100RM, CAA26413RM, NP033799RM) [Hagenbuchle 1980; Hagenbuchle 1981; Tosi 1984; Gumucio 1985; Bodary 1985; Schibler 1982], reportados también en la tabla 5, se observó que el fragmento con el mayor índice de hidrofiliidad es la secuencia: Glu-Asp-Glu-Phe-Arg-Asp, que corresponde al segmento de los aminoácidos del 75 al 80, cuyo valor de $A_h = 2.08$. En cuanto a la capacidad antigénica hipotética está la secuencia: Ala-Lys-Glu-Cys-Glu-Arg, que corresponde al segmento que va del aminoácido 24 al 29 con un valor de $A_h = 1.75$, y finalmente en tercer lugar esta un segmento de siete aminoácidos con una secuencia: Arg-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Glu, que corresponde a los aminoácidos que van del 71 al 77 con un índice de hidrofiliidad de $A_h = 1.58$.

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

homólogo (asparagina y aspártico en la amilasa porcina y de ratón, respectivamente).

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

b) Cuantificación de la amilasa de ratón por ELISA

Para realizar la determinación de amilasa por este ELISA, se estableció una competencia entre la amilasa fijada en la microplaca y la amilasa liberada en el baño en el cual se encontraba suspendido el páncreas aislado de ratón. La lectura de la reacción inmunológica se realizó contra una curva estándar (figura 30).

Por este método la evaluación del efecto antagónico de los extractos hexánico y metanólico de *B. temifolia* sobre la descarga de amilasa del páncreas aislado de ratón, mostró que existe un comportamiento dependiente de la concentración de veneno. La CE_{50} del veneno se estableció en $0.00266 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ésta aumentó a 0.00221 y $0.00915 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en presencia de los extractos metanólico y hexánico, respectivamente. Respecto al $E_{\max}$ se observó una disminución desde $0.00133 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ provocado por el veneno hasta 0.000351 y $0.000722 \text{ UA}\cdot\text{L}^{-1}$ en presencia de los extractos metanólico y hexánico en el mismo orden (figura 31).

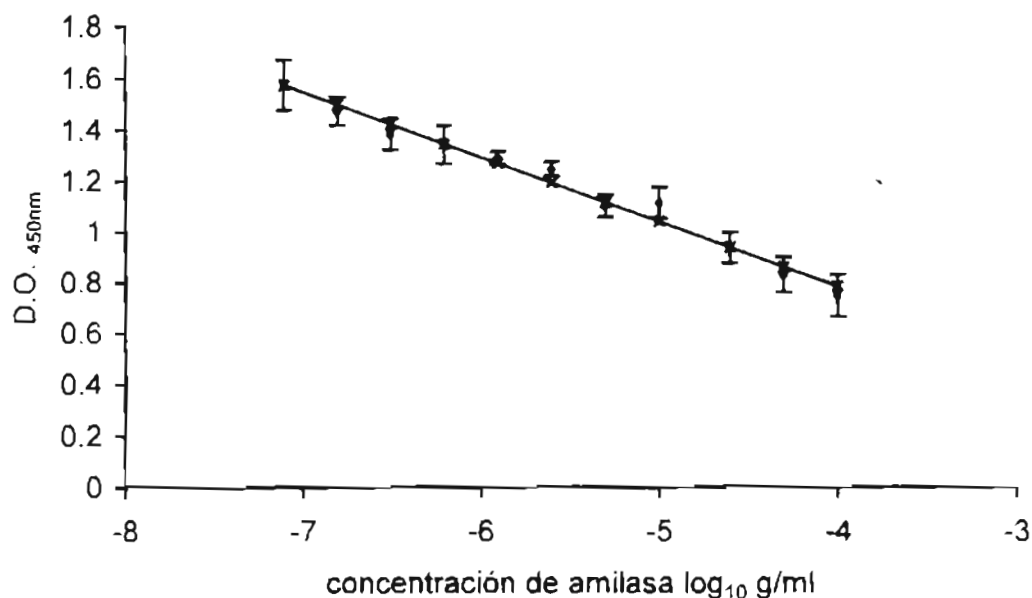


Figura 30. Curva estándar para la determinación de amilasa por el método ELISA. Ecuación de la recta: $y = -0.2549 (x) - 0.2384$

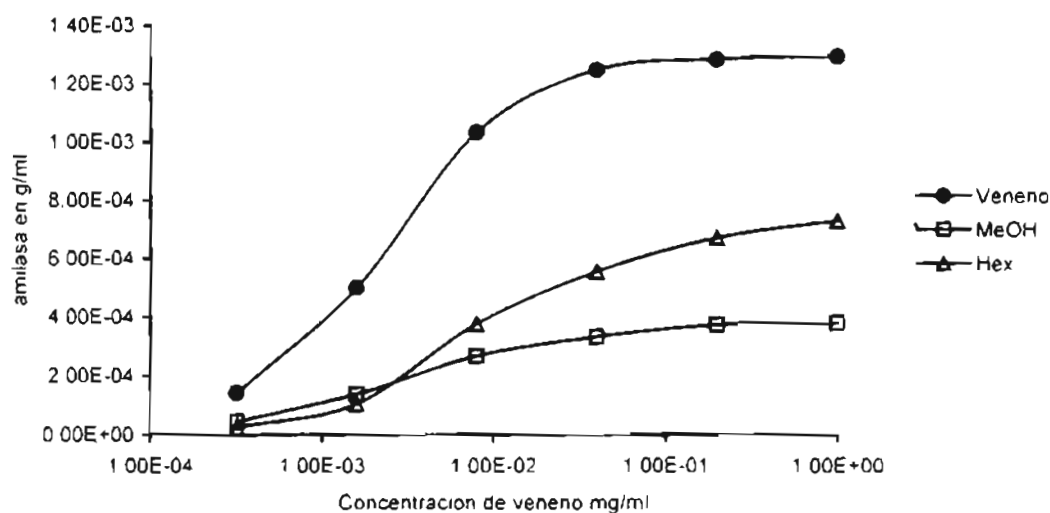


Figura 31. Liberación de la amilasa, medida por ELISA, en páncreas aislado de ratón, provocado por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*. Efecto de contención de la descarga pancreática de amilasa por los extractos hexánico (Δ) y metanólico ($\square$) de *Bouvardia ternifolia*. CE_{50} fue de $0.00266 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en presencia de veneno y aumentó a $0.00221 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con extracto metanólico y $0.00915 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con extracto hexánico, E_{max} del veneno $0.00133 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$; extracto metanólico fue de $0.000351 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$; extracto hexánico fue de $0.000722 \text{ UA} \cdot \text{L}^{-1}$.

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

En ratas íntegras la administración *i.v.* de veneno de *C. limpidus limpidus* indujo una pancreatitis aguda que se caracterizó por el edema masivo del páncreas y los tejidos retroperitoneales adyacentes. El efecto se cuantificó por la extravasación de la albúmina sérica (observada en el intersticio del páncreas) marcada con azul de Evans y se expresó por gramo de tejido en peso fresco. El edema producido por el veneno de alacrán, resultado de un incremento en la permeabilidad vascular, mostró un comportamiento dosis dependiente. En este mismo modelo, el pretratamiento por la vía *i.p.* con los extractos metanólicos y hexánicos de *A. elegans* y *B. ternifolia* redujeron el edema inducido por el veneno. El efecto fue más intenso a la dosis más alta del veneno ($500\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$), los extractos fueron capaces de reducir significativamente ($p < 0.05$) la extravasación del líquido plasmático en aproximadamente 60%. En este modelo no fue posible establecer el efecto máximo, debido a que las dosis mayores de $500\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ causó la muerte del animal antes de que el periodo de exposición hubiera terminado (figuras 32 y 33).

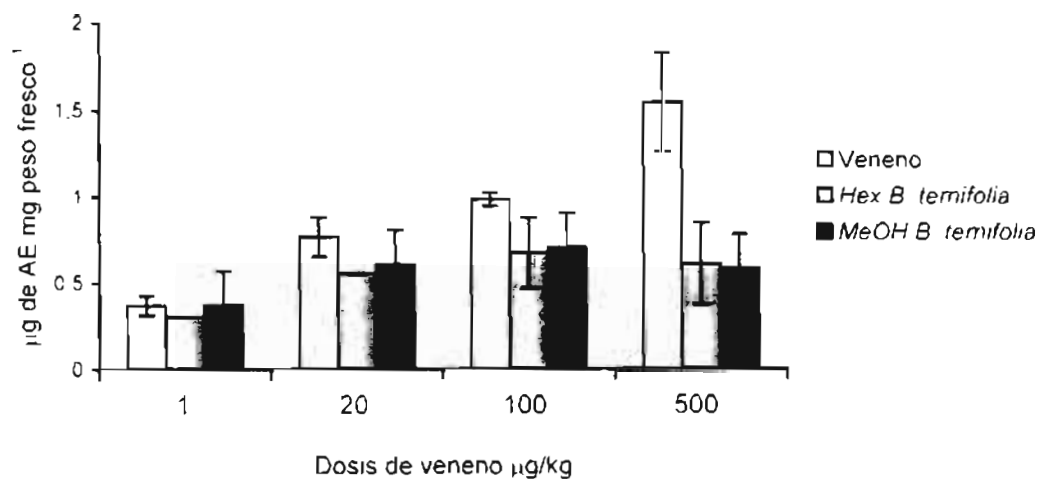


Figura 32. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Bouvardia ternifolia* sobre la extravasación de líquido plasmático en páncreas de ratas intoxicadas con veneno de *C. limpidus limpidus*. Cada barra muestra el promedio de 3 determinaciones $\pm$ D.E.

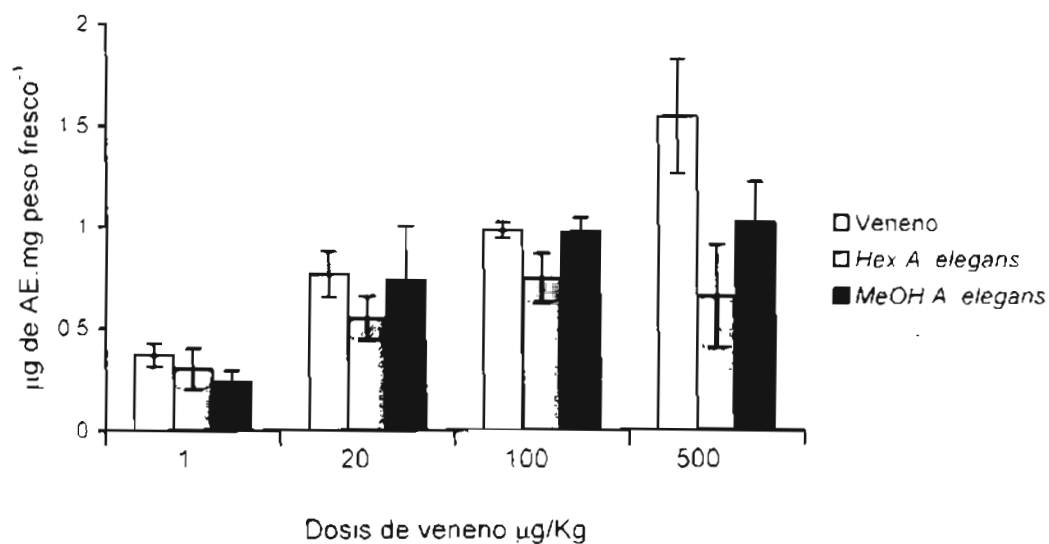


Figura 33. Efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* sobre la extravasación de líquido plasmático en páncreas de ratas intoxicadas con veneno de *C. limpidus limpidus*. Cada barra muestra el promedio de 3 determinaciones $\pm$ D.E.

DISCUSIÓN.

Dehesa-Dávila y colaboradores (1995) reportaron que la DL_{50} del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* es un parámetro que depende de la cepa de ratón (0.61 y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). En el presente trabajo se obtuvo una DL_{50} de $0.75 \pm 0.088 \text{ mg/Kg}$ en ratones de la cepa Balb-C, resultado que apoya el procedimiento experimental seguido y es indicativo de que el veneno utilizado en estos experimentos contiene suficiente concentración de toxinas específicas contra los mamíferos y de que corresponde *Centruroides limpidus limpidus*, la especie endémica de la región. En términos generales, los resultados demuestran que los extractos vegetales de *Bouvardia ternifolia* y *Aristolochia elegans* fueron inhibidores de la letalidad producida por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* en los ratones. El extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* mostró el efecto más potente, aumentó la DL_{50} en 2.2 veces, sin embargo, no es comparable con el del antisuero específico que incrementa la DL_{50} aproximadamente en 150 veces. Dado que el extracto hexánico de *Bouvardia ternifolia* contiene una gran variedad de compuestos cabría suponer que la capacidad antitóxica podría incrementarse con la separación química de los compuestos activos. Una situación similar ocurriría con el extracto hexánico de *Aristolochia elegans*, el cual tuvo la capacidad de incrementar la DL_{50} en 1.38 veces.

Respecto al efecto que produce el veneno de alacrán sobre la excitabilidad de la musculatura lisa intestinal *in vitro*, existen reportes en la literatura sobre la respuesta contráctil que produce el veneno de *Tytlus*

serrulatus (Matos y col. 1999). El veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, al igual que lo reportado para el de *Tytlus serrulatus*, provoca una contracción sostenida y reproducible en íleon de cobayo, con una elevación significativa de la línea basal de tensión y contracciones periódicas superpuestas. Los autores atribuyen este comportamiento del tejido a la liberación inicial de ACh y a la participación de la sustancia P. Los extractos hexánico y metanólico de *Aristolochia elegans* y de *Bouvardia tenifolia*, inhibieron de manera dependiente de la concentración, la contracción producida por el veneno con un efecto cercano al 70%. Además, las contracciones rítmicas, periódicas superpuestas fueron abolidas.

Al menos 29 compuestos han sido identificados en la raíz de *Aristolochia elegans* (Vila 1997). Entre ellos, borneol y acetato de bornilo, compuestos a los que se han descrito propiedades antagonistas de los efectos de la ACh en la médula suprarrenal (Park 2003; Tachikawa 2000), probablemente, inhibiendo la liberación masiva de catecolaminas. Al efecto de estos compuestos se adiciona la actividad del α -pineno, cuya acción relajante sobre el íleon aislado de cobayo ha sido demostrada (Sadraei 2001).

Los efectos del veneno en las aurículas aisladas de rata, se han atribuido también a la liberación de neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos. Estudios reportados por Texeira (2001) demuestran que el incremento en la frecuencia cardíaca inducida por el veneno fue totalmente inhibido por antagonistas adreno-receptores β_1 o por la denervación

simpática química con 6-hidroxidopamina. En contraste con estas observaciones el incremento en la fuerza de contracción inducida por el veneno no se modificó por el bloqueo de adreno-receptores β_1 o por denervación simpática química. De tal manera que los efectos cronotrópicos del veneno de *Tytius serrulatus* dependen de la liberación de neurotransmisores, pero el efecto inotrópico no depende de la liberación de neurotransmisores. El incremento en la contractibilidad, independiente de los neurotransmisores, parece ser una acción directa del veneno sobre los cardiomiocitos (Teixeira, 2001). Estos antecedentes permiten suponer la presencia de compuestos antiadrenérgicos en los extractos de ambas plantas o bien con base en la desaparición del efecto inotrópico positivo posterior a la administración de los extractos, se puede especular sobre la presencia de calcio-antagonistas que actúan sobre la aurícula intoxicada con veneno de *C. limpidus limpidus*.

Los componentes responsables de la toxicidad del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* residen en tres neurotoxinas específicas que reconocen el canal de sodio y son clasificadas como toxinas del tipo β (Lebreton 1994; Ramírez 1988); también se ha reportado una toxina dirigida contra canal de potasio (Martin 1994). La interacción de la toxina β con el canal de sodio se da por unión al sitio cuatro del canal, es independiente del voltaje y afecta la activación del canal provocando un incremento de la conductancia del Na^+ (Jover 1980; Catterall 1996). El incremento de la conductancia del canal de sodio produce una liberación masiva de ACh, lo

cual puede explicar la mayoría de las manifestaciones clínicas de la intoxicación con veneno de alacrán (Montoya-Cabrera 1996; Ismail 1995). Con respecto a la toxina específica contra canal de potasio, presenta una concentración $< 0.1\%$ en relación con las toxinas dirigidas contra el canal de sodio. El veneno de *Centruroides noxius* es el único al que se le han descrito toxinas específicas contra canal de potasio que afecta al humano (Olamendi-Portugal 1996; Nieto 1996).

En estado crítico, la picadura de alacrán desarrolla en los pacientes procesos inflamatorios en el páncreas y en el pulmón (D'Suze 1999; Gallagher 1981; Matos 1997; Possani 1991). En el caso de picaduras de alacranes del género *Tytius* y *Leíurus*, la inflamación aguda del páncreas forma parte fundamental de la sintomatología de la intoxicación. Sin embargo, hasta la fecha, no se había evidenciado que el veneno del *Centruroides limpidus limpidus* provoca inflamación aguda del páncreas. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio la liberación de azul de Evans en el páncreas de ratas intoxicadas con veneno de *Centruroides limpidus limpidus* permite asumir que el veneno produce edema agudo de páncreas con un comportamiento dosis dependiente, lo cual representa una considerable contribución a la caracterización toxicológica del veneno del alacrán endémico del estado de Morelos y Guerrero. Los extractos hexánicos y metanólicos tanto de *Bouvardia ternifolia* como de *Aristolochia elegans*, redujeron el edema pancreático de manera muy evidente a una dosis $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

La capacidad secretagoga, de amilasa en páncreas aislado de ratón, del veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, se puede deber a una estimulación suprafisiológica asociada con la liberación masiva de ACh, ya que, alrededor del 40% de esta actividad secretagoga fue antagonizada por atropina. Así mismo, la sustancia P (SP) juega un papel muy importante (Matos 1999), se une a los receptores NK1-R los cuales están unidos a su vez a una proteína de las células endoteliales e induce la formación de interrupciones de la continuidad entre las células endoteliales en las vénulas postcapilares (Boewden 1994). La albúmina y el líquido plasmático permean hacia el espacio intersticial a través de estas interrupciones de la continuidad endotelial, resultando en un edema inflamatorio. Así se explica el edema generado por la caruleína, la cual aumenta la permeabilidad vascular (Grady 2000). En el presente estudio se demostró extravasación del azul de Evans en el intersticio pancreático provocado por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*. El azul de Evans es ampliamente utilizado como marcador en alteraciones de la permeabilidad vascular asociadas con un proceso inflamatorio. El proceso inflamatorio fue antagonizado por los extractos de ambas plantas estudiadas, efecto que concuerda con la capacidad que demostraron tener de estos extractos para reducir la amilasa liberada en el páncreas por la acción del veneno de alacrán.

La actividad de una sustancia se describe generalmente en relación a la concentración que se requiere para alcanzar el efecto máximo en un sistema que se encuentra saturado. Sin embargo, en el modelo del páncreas aislado de ratón, el antagonismo de los extractos de *Bouvardia tenifolia*

sobre el efecto secretagogo del veneno fue enmascarado por la actividad inhibitoria que ejercieron los extractos sobre la amilasa, situación que no se observó con los extractos de *Aristolochia elegans*. En el caso de los extractos de *Bouvardia ternifolia*, si se sustrae la inhibición de la amilasa del efecto de contención de la descarga pancreática de amilasa, se observa que el extracto metanólico es más eficiente para contener la descarga pancreática provocada por la exposición al veneno de *Centruroides limpidus limpidus*.

Por otra parte el antagonismo que presentan los extractos de *Aristolochia elegans* y de *Bouvardia ternifolia* sobre la liberación de amilasa inducida con carbamilcolina, demostró que la actividad de los extractos es causada, en parte, por un mecanismo anticolinérgico, sin embargo, no se puede descartar que existan compuestos en estas plantas que actúen disminuyendo la secreción de amilasa por otro mecanismo.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el veneno *Centruroides limpidus limpidus* posee efectos secretagogos de amilasa en el páncreas aislado de ratón, además, desarrollar un proceso inflamatorio agudo en el páncreas de la rata integra; estos efectos fueron eficientemente antagonizados por los extractos hexánicos y metanólicos de las raíces de *Aristolochia elegans* y *Bouvardia ternifolia*. La pancreatitis aguda, puede ser resultado de múltiples mecanismos, los cuales pueden ser contrarrestados por los efectos farmacológicos descritos para los ácidos ursólico y oleanólico (Liu 1995) presentes en el extracto de *Bouvardia ternifolia*, han sido descritos como inhibidores de la liberación de histamina en las células cebadas

(Tsuruga 1991). La histamina incrementa la permeabilidad vascular y promueve la formación del edema asociado a la pancreatitis aguda (Harvey 1987; Dib 2002); la capacidad que tienen los extractos de *Bouvardia ternifolia* para antagonizar el edema producido por el veneno de *Centruroides limpidus limpidus* podría involucrar un efecto sobre la liberación de histamina. Por otro lado, la ciclooxigenasa y lipooxigenasa son dos enzimas inflamatorias, que modulan su actividad en presencia de los ácidos ursólico y oleanólico, entonces éstos ácidos reducen la producción de mediadores proinflamatorios provenientes del ácido araquidónico (Liu 1995). También se ha demostrado que el ácido oleanólico es un inhibidor de la síntesis y liberación de prostaglandina E₂ y de leucotrienos B (Simon 1992; Zhou 1993). En la pancreatitis aguda se liberan grandes cantidades de enzimas proteolíticas que producen la autodigestión del tejido pancreático y originan necrosis, una de las más severas complicaciones del padecimiento (Yamaguchi 1989). Los ácidos ácido ursólico y oleanólico presentan constantes de inhibición de la elastasa (4.4 y 6.4 μ M, respectivamente) (Ying 1991), esta característica puede explicar la capacidad de contrarrestar los posibles efectos antinecróticos en el páncreas, de los extractos de *Bouvardia ternifolia* del extracto a nivel pancreático. En el modelo de inducción de pancreatitis aguda, se ha demostrado un incremento importante en la generación de radicales libres, y la consecuente la peroxidación de lípidos (Nonaka 1992). El ácido oleanólico es un potente protector contra la peroxidación de lípidos, mientras que el ácido ursólico presenta baja capacidad para proteger al

miocardio y microsomas del hígado, sin embargo, la mezcla ambos triterpenos incrementa de manera significativa la protección contra la peroxidación de lípidos (Balanehru 1992). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, cabe suponer que los extractos de *Bouvardia ternifolia* tienen la capacidad de contrarrestar la inflamación pancreática producida por la intoxicación de veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, debido a las múltiples acciones de los ácidos ursólico y oleanólico.

Respecto a la actividad antiinflamatoria de los extractos *Aristolochia elegans* (Vila 1997) se han identificado algunos compuestos que pueden estar involucrados: γ -cadineno, 1,8-cineole, magnoflorina, α -pineno, α -caryophylleno, β -sitosterol (El-Sebakhy 1984) y ácido aristolóchico (Lenfeld 1986; Santos 2000; Juergens 1998; Santos 2001; Kupeli 2002; Martin 1993; Kuhnt 1993; Mors 2000). Este último inhibidor de la fosfolipasa A2 (Vishwanath 1987), y por lo tanto de la liberación de mediadores proinflamatorios que derivan de la hidrólisis de fosfolípidos. También se han identificado en la raíz de *Aristolochia elegans* compuestos que presentan actividad vaso-relajante: magnoflorina (El-Sebakhy 1984; Sotnikova 1997) 1,8-cineole (Vila 1997; Lahlou 2002).

CONCLUSIONES.

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

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

15. Carlos Faria Santos Amaral, Nilton Alvez Rezende Lineu Freire-Maia (1993) Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am J Cardiol* 71:242-245.
16. Catterall WA (1980). Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:15-43.
17. Catterall WA (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channel. *Annu Rev Biochem* 55: 953-985.
18. Catterall WA (1996). Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 28:219-230.
19. Ciosa D, Rosello-Catafau J, Hotter G, Bulbena O, Fernández-Cruz L, Gelpi E (1993) Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism in sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats. *Prostaglandins* 45:315-322
20. Corona M, Gurrola GB, Merino E, Cassulini RR, Valdez-Cruz NA, Garcia B, Ramirez-Dominguez ME, Coronas FI, Zamudio FZ, Wanke E, Possani LD. 2002 A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Lett*.532:121-126
21. Cunha-Melo JR, Freie-Maia L., Tafuri WL, Maria TA (1973) Mechanisms de action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. *Toxicon*11:81-84.
22. Dehesa-Dávila M (1986) Avances en el tratamiento farmacológico de la picadura de alacrán. *Salud Pub Mex* 28: 83-91.
23. Dehesa-Dávila M, Alagón A, Possani LD (1995) Clinical toxicology of scorpion sting. In: *Clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Jürg Meir Julian White Ed. CRC Press USA, 221-238.
24. Dehesa-Dávila M, Posanni L. (1994) Scorpionismo and serotherapy in México. *Toxicon*. 32: 1015-1018.
25. D'Suze G, Comellas A, Pesce L, Sevcik C, Sánchez de León R (1999) *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress síndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37:173-180
26. D'Suze G, Corona F, Possani LD, Sevcik C. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 1996; 34(5):591.
27. Darnis S, Juge N, Guo XJ, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Chaix JC. (1999) Molecular cloning and primary structure analysis of porcine pancreatic alpha-amylase *Biochim. Biophys. Acta* 1430:281-289.
28. Diniz CXR, Pimienta AF, Coutinho-Netto J, Pompolo S, Gomez MV, Böhm GM (1974) Effect of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (tityustoxin) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. *Experientia*:30:1304.
29. El-Sebakhy N, Waterman PG (1984) (-)-(R,R)-7'-O-methylcuspidaline from the leaves of *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* 23:2706-2707.

30. Fletcher M, Possani LD, Fletcher Jr, P (1994) Morphological studies by light and electron microscopy of pancreatic acinar cells under effect of *Tityus serrulatus* venom. *Cell Tissue Res* 278: 255-264.
31. Flores P R (1963) Sintomatología y tratamiento de la picadura de alacrán. *Rev. Inst. Eferm. Trop. (Mex)*, 23,175-179.
32. Fontecilla-Camps JC, Alamassy RJ, Suddath FL, Watt DD, Bugg CE (1980) Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6496-6500.
33. Gallagher S, Sankaran H, Williams JA (1981) Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas. *Gastroenterology* 80:970-973.
34. Gilles C, Astier JP, Marchis-Mouren G, Cambillau C, Payan F. (1996) Crystal structure of pig pancreatic alpha-amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose *Eur J Biochem* 238:561-569
35. Gordon D, Martin-Euclaire MF, Cestele S. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem* 271:8034.
36. Goyffon M, Vachon M, Broglio N (1982) Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon* 20:337
37. Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard N, Bunnett NW y Kirkwood S (2000) Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* 130:505-512.
38. Granja Bermúdez V M, Martínez Zuñiga R, Chico Aldama P. 1999 *Rev Alerg, Asma e Inmunol Pediatr.* 8:109-112
39. Gueron M, Adolph RJ, Grupp IL, Gabel M (1980) Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. *Am J Cardiology* 45:979
40. Gueron M, Ilia R, Sofer S (1992) The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. *J Toxic Clin Toxicol.* 30:245-258
41. Gueron M, Sofer S 1994. The role of the intensivist in the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 32:1027-1029.
42. Gumucio DL, Wiebauer K, Dranginis A, Samuelson LC, Treisman LO, Caldwell RM, Antonucci TK, Meisler MH. (1985) Evolution of the amylase multigene family. YBR/Ki mice express a pancreatic amylase gene which is silent in other strains. *J Biol Chem* 260:13483-13489.
43. Hagenbuehle O, Bovey R, Young RA (1980) Tissue-specific expression of mouse-alpha-amylase genes: nucleotide sequence of isoenzyme mRNAs from pancreas and salivary gland *Cell* 21 179-187
44. Hagenbuehle O, Tosi M, Schibler U, Bovey R, Wellauer PK, Young RA. (1981) Mouse liver and salivary gland alpha-amylase mRNAs differ only in 5' non-translated sequences *Nature* 289:643-646

45. Haruna A, Choudhury M (1995) In vivo anti-snake venom activity of a furanoid diterpene from *Aristolochia albida* Duch (Aristolochiaceae). *J Pharm Sci* 57: 222-223.
46. Harvey MH, Wedgwood KR, Reber HA (1987) Vasoactive drugs, microvascular permeability, and hemorrhagic pancreatitis cats. *Gastroenterology* 93:1296-1300.
47. Hernández F (1969) Obras completas tomo III. Historia Natural de la Nueva España. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico.
48. Ho WZ, Starvropoulos G, Lai JP, Hu BF, Magafa V, Anagnostides S, Douglas SD (1998) Substance P C-terminal octapeptide analogues augment tumor necrosis factor- α release by human blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmunol* 82:126-132.
49. Hoffman A "El Maravilloso mundo de los arácnidos " Fondo de Cultura Económico: La Ciencia desde México; 1993 No. 116. México D.F.
50. Hoffmann C y Nieto, R 1939. Segunda contribución al conocimiento de los alacranes mexicanos. *Anales Inst. Biología* 10:83-92.
51. Huang YB, Fang JY, Hung CH, Wu PC, Tsai YH (1999) Cyclic monoterpene extract from cardamom oil as a skin permeation enhancer for indometacin: in vitro and in vivo studies. *Biol Pharm Bull* 22:642-646
52. Hutt MJ, Houghton PJ (1998) A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. *J Ethnopharmacol* 60: 97-100.
53. Instituto Nacional Indigenista (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Ed. México. Vol II, III, 537-538, 691, 1362-1363.
54. Ismail M (1995) The scorpion envenoming síndrome. *Toxicon* 33:825-858.
55. Jover E, Couraud E, Rochat H (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1607-1614.
56. Juergens UR, sober M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T, Vetter H (1998) Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *Eur J Med Res* 17:407-412.
57. Karnad DR (1998) Haemodynamic patterns in patients with scorpion envenomation. *Heart* 79:485-489
58. Keegan, L (1980) Scorpions of medical importance. University Press of Mississippi, Jackson, MI. pp 140
59. Kuhnt M, Probstle A, Rimpler H, Bauer R, Heinrich M (1993) Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Med* 59:533-536.
60. Kupeli E, Kosar M, Yesilada E, Husnu K, Baser C (2002) A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effect of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish berberis species. *Life Sci* 72:645-657.

61. Lagunas-Flores A, Rojas-Molina N (1983) Experiencia clínica en 147 niños con picadura de alacrán en Acapulco, Guerrero, Mex. Rev. Med. IMSS (Mex) 21:270-275
62. Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhaes PJ, Leal-Cardoso JH (2002) Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oil, in normotensive rats. Can J Physiol Pharmacol 80:1125-1131.
63. Larson SB, Greenwood A, Cascio D, Day J, McPherson A (1994) Refined molecular structure of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. J Mol Biol 235:1560-1584.
64. Lebreton F, Delepierre M, Ramírez AN, Balderas C, Possani LD (1994) Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. Biochemistry 33: 11135-11149.
65. Lefkowitz RS, Hoffman BB, Taylor P (1996) Sistemas nerviosos autónomo y motor somático. En: Goodman y Gilman, editor. **Bases farmacológicas de la terapéutica**. México: Mc Graw-Hill-Interamericana; 1996. Vol I, p. 113
66. Lenfeld J, Motl O, Trka A (1986) Anti-inflammatory activity of extracts from *Conyza canadensis*. Pharmazie 41:268-269.
67. Litchfield T y Wilcoxon F (1949) Simplified method of evaluating dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Ther 96:99-113.
68. Liu J (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J Ethnopharmacol 49:57-68.
69. Lozoya X, Aguilar A, Camacho JR (1987) Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. Rev Med IMSS 25: 283-291.
70. Machius M, Vertesy L, Huber R, Wiegand G. (1996) Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. J Mol Biol 260:409-421.
71. Martin BM, Ramírez AN, Gurrola GB, Nobile M, Prestipino G, Possani LD (1994) Novel K(+)-channel-blocking toxins from the venom of scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. Karsch. Biochem J 304: 51-56.
72. Martin S, Padilla E, Ocete MA, Galvez J, Jimenez J, Zarzuelo A (1993) Anti-inflammatory activity of the essential of *Bupleurum fruticescens* Planta Med 59:533-536.
73. Matos IM, Rocha OA, Leite R, Freire-Maia L (1997) Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rat. Biochem Physiol 118C:143-148.
74. Matos IM, Texeira MM, Leite R, Freire-Maia L (1999a) Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum Eur J Pharm 368 231-236.

75. Matos IM, Souza DG, Seabra DG, Freire-Maia L (1999b) Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur. J. Pharmacol* 376:293-300
76. Montoya-Cabrera MA (1996) Alacranismo. *Gac Med Mex* 132: 645-648.
77. Mors WB, DoNascimento MC, Ruppelt-Pereira BM, Pereira NA (2000) Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* 55:627-642.
78. Müller GJ (1993) Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious scorpion envenomations. *S Afr Med J* 83:405 - 7.
79. Murugesan S, Radha Krishna Murthy K, Noronha OPD, Samuel AM (1999) Scorpion venom: Labelling, biodistribution and scintimaging. *Venom. Anim. Toxins*. 5 (1): 35-46
80. Nieto A, Gurrola G, Vaca L, Possani LD (1996) Noxiustoxin 2, a novel K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 34: 913-922.
81. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T (1992) Evidence for a role of free radicals by synthesized scavenger, 2-octadecylascorbic acid, in cerulein-induced mouse acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 37:274-279.
82. Olamendi-Portugal T, Gómez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD (1996) A novel structural class of K⁺-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 315: 977-981.
83. Park TJ, Park YS, Lee TG, Ha H, Kim KT (2003) Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol. *Biochem Pharmacol* 65:83-90
84. Pasero L, Mazzei-Pierron Y, Abadie B, Chicheportiche Y, Marchis-Mouren G (1986) Complete amino acid sequence and location of the five disulfide bridges in porcine pancreatic alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta* 869:147-157.
85. Payan F, Haser R, Pierrot M, Frey M, Astier JP, Abadie B, Duee E, Buisson G (1980) The three-dimensional structure of alpha-amylase from porcine pancreas 5 angstrom resolution - the active-site location. *Acta Crystallogr B* 36, 416-421.
86. Pérez GRM, Pérez GC, Pérez G S, Zavala S (1998) Effect of triterpenoids of *Bouvardia ternifolia* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine* 5: 475-478.
87. Possani LD, Martin BM, Fletcher MD, Fletcher PL (1991) Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produce by toxin purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J Biol Chem* 266:3178-3185
88. Possani LD, Selisko B, Gurrola GB (1999) Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. In *Perspectives in drug discovery*. Kluwer/Escom. Kluwer Academic Publisher. Netherlands vol 15/16 pp15-40
89. Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E, Payan F (1994) The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a

- pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33:6284-6294.
90. Qian M, Haser R, Payan F. (1993) Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 A resolution. *J Mol Biol* 231:785-799.
 91. Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E y Payan F (1994) The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33:6284-6294
 92. Qian M, Haser R, Payan F. (1995) Carbohydrate binding sites in a pancreatic alpha-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 A resolution *Protein Sci.* 4:747-755.
 93. Ramirez AN, Martin BM, Gurrola GB, Possani LD (1988) Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon* 32: 479-490.
 94. Rastrelli L, Capasso A, Pizza C, De Tommasi N (1997) New protopine and benzyltetrahydropeotoberberine alkaloids from *Aristolochia constricta* and their activity on isolated guinea-pig ileum. *J Nat Prod* 60:1065-1069.
 95. Rogers JC, Qu Y, Tanada TN, Sctheuer T, Catterall WA (1996) Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271:15950.
 96. Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Gomez MV, Moraes-Santos T, Brammer MJ, (1994) Tityustoxin-mediatend Na⁺ influx is more efficient than Kcl depolarization in promoting Ca²⁺ dependent glutamate release from synaptoasoms. *Neurosci Lett* 199:90-92
 97. Romi-Lebrun R, MartIn-Eauclairem MF, Escoubas P, Wu FQ, Lebrun B, Hisada M, Nakajima T (1997) Characterization of four toxins from *Buthus martensi* scorpion venom, which act on apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur J Biochem* 245,457
 98. Sadraei H, Asghari GR, Hajhashemi V, Kolagar A, Ebrahimi M (2001) Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula humosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine* 2001 8:370-376
 99. Santos FA, Rao VS (2000) Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils *Phytother Res* 14:240-244
 100. Santos FA, Rao VS (2001) 1,8-cineole, a food-flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury rats. *Dig Dis Sci* 46:331-337
 101. Saria A, Lundberg JM (1983) Evans blue fluorescence quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues *J Neurosci Methods* 8, 41-49
 102. Schibler U, Pittet AC, Young RA, Hagenbuchle O, Tosi M, Gellman S, Wellauer PK. (1982) The mouse alpha-amylase multigene family Sequence organization of members expressed in the pancreas salivary gland and liver *J Mol Biol* 155:247-266.

103. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. Sistema único de información 2002; 19 (44)
104. Shivanand D, Hoffman JJ, Torrence SJ, Wiedhopf RM, Cole JR, Arora SK, Bates RB, Gargiudo RL, Kriek GR (1977) Bouvardin y deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J Am Chem Soc* 99: 8040-8044.
105. Simon A, Najid A, Chulia AJ, Delage C, Rigaud M (1992) Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim Biophys Acta* 1125:68-72.
106. Sofer S., Shalev H., Weizman Z., Shahak E., Gueron M. 1991. Acute pancreatitis in children following envenomation by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 29,125-128;
107. Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK (2002) Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1166-1174.
108. Sotnikova R, Kettmann V, Kostalova D, Taborska E (1997) Relaxant properties of some aporphine alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19:589-597
109. Tachikawa E, Takahashi M, Kashimoto T (2000) Effects of extracts and ingredients isolated from *Magnolia obovata* thunberg on catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol* 60:433-440.
110. Teixeira AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CR, Camargos ER, Teixeira MM. (2001) Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle *Toxicon*.39:703-709
111. Tosi M, Bovey R, Astolfi S, Bodary S, Meisler M, Wellauer PK. (1984) Multiple non-allelic genes encoding pancreatic alpha-amylase of mouse are expressed in a strain-specific fashion. *EMBO J.* 3:2809-2816.
112. Tsuruga T, Chun YT, Ebizuka Y Sankawa U (1991) Biologically active constituents of *Melaleucas leucadendron* inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem Pharm Bull* 39:3276-3278.
113. Vila R, Mundina M, Muschietti L, Priestap H, Bandoni AL, Adzet T, Cañigueral S (1997) Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* 46:1127-1129.
114. Vishwanath BS, Appu Rao AG, Gowda TV (1987) Interaction of phospholipase A 2 from *Vipera russelli* venom with aristolochic acid a circular dichroism study. *Toxicon* 25:939-946
115. Wiegand G, Epp O, Huber R. (1995) The crystal structure of porcine pancreatic alpha-amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J Mol Biol* 247:99-110
116. World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms WHO offset publication, vol. 58 WHO. Geneva.

117. Yamaguchi H, Kimura T, Mimura K, Nawata H (1989) Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 4:565-571.
118. Yatani A, Kirsch GE, Possani LD, Brown AM. Effects of new world scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *Am J Physiol* 254:443.
119. Ying QL, Rinehart AR, Simon SR, Cheronis JC (1991) Inhibition of human leucocytes elastase by ursolic acid. *Biochem J* 277:521-526
120. Zhou C, Sun X, Liu W, Shi H, Gao H, Miao Y (1993) Effects of oleanolic acid on the immune complex allergic reaction and inflammation. *J Clin Pharm Sci* 2:69-79



Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning

J.E. Jiménez-Ferrer^a, Y.Y. Pérez-Terán^a, R. Román-Ramos^b, J. Tortoriello^{a,*}

^aInstituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Centro de Investigación Biomédica del Sur, Argentina 1, 62790 Xochitepec, Morelos, México

^bDepartamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, México DF México

Received 24 April 2004; accepted 16 October 2004

Abstract

Scorpions, especially in urban areas of tropical and subtropical regions, present a common risk of poisoning. In Mexico, scorpion envenomation is considered a public health problem. Despite the frequency of scorpion sting cases, there are to date no uniform criteria for their treatment. In Mexican traditional medicine, different plant species have been widely used as a remedy for treating scorpion poisoning. The aim of this work was to evaluate the effect of *Bouvardia ternifolia*, *Aristolochia elegans* and *Vitex mollis* extracts on *Centruroides limpidus limpidus* venom lethality in mice, and to determine their antagonist activity on guinea pig ileum. The hexane and methanol extract from *B. ternifolia* modified the LD₅₀ of *C. limpidus limpidus* venom from 0.750 ± 0.08 to 1.64 ± 0.19 and 1.16 ± 0.14 mg/kg, respectively. The extracts of *A. elegans* produced lower antitoxic activity, while extracts of *V. mollis* did not show any protection. On in vitro test, addition of *B. ternifolia* and *A. elegans* extracts strongly inhibited, in a concentration-dependent manner, the ileum contractions induced by venom. In general, the results demonstrated the effectiveness of these two plant species in modifying the lethality of *C. limpidus limpidus* venom in mice.

© 2004 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Scorpion; Medicinal plants; *Centruroides limpidus limpidus*; *Bouvardia ternifolia*; *Aristolochia elegans*; *Vitex mollis*

Introduction

Scorpion poisoning is common in tropical and subtropical regions, particularly in northern Africa, Latin America, India and the Middle East (Abroug et al., 1999). In Mexico, scorpionism represents a public health problem. Of the 136 scorpion species and subspecies endemic in Mexico, only eight represent a lethal risk for humans (Dehesa-Dávila et al., 1995). These eight are responsible for the approximately

200,000 cases of scorpion sting incidents reported annually in Mexico. Nevertheless, the exact number of cases on humans is unknown (Dehesa-Dávila et al., 1995); if unreported cases were considered, the amount could reach 500,000 (Calderon-Aranda et al., 1993). In Mexico, the most affected regions for scorpion poisoning are the states of Morelos and Guerrero, in these areas, the endemic scorpion species is *Centruroides limpidus limpidus* Karsch.

Despite the frequency and importance of scorpion sting cases, there are to date no uniform criteria for their treatment. The latter is usually based on support of vital

*Corresponding author. Tel./fax: +52-777-361-2155.

E-mail address: jtortoriello@yahoo.es (J. Tortoriello).

functions; horse antiserum is administered in some patients who show progressive symptomatology.

In Mexico, and particularly in rural areas that are the most affected, medicinal plants have been widely used as a remedy for treating scorpion poisoning (Lozoya et al., 1987). Ethnic groups from these zones use herbal remedies against this type of accident without the antivenom administration (serotherapy), that is, the therapeutic process accepted at present (Dehesa-Dávila, 1986; Hutt and Houghton, 1998).

Aristolochia elegans Mast. (Aristolochiaceae) is probably the plant species most commonly used in the state of Morelos for treatment of scorpion poisoning in patients. It belongs to an old, well-known family with several medical applications such as hystero tonic, emmenagog, expectorant, and as an antispasmodic (Hernández, 1969). This plant is used in Mexico as an antimicrobial, antitumor, antidiarrhea, antipyretic, anti-snake venom, and emmenagog (INI, 1994). It has been pharmacologically demonstrated that plants from the *Aristolochia* genus possess an anti-inflammatory activity related to the presence of aristolochic acid, a characteristic substance of the genus. This compound is a phospholipase-specific inhibitor and is therefore able to diminish the release of pain and inflammation mediators (Hutt and Houghton, 1998). It has been demonstrated that due to their anticholinergic properties, extracts from this genus, modified spontaneous guinea pig ileum activity (Rastrelli et al., 1997). *Bouvardia ternifolia* Schltdl (Rubiaceae) is an endemic plant from the Mexican meseta; its roots have been used in remedies for snake bite, and scorpion, spider, and centipede stings, as it probably possesses analgesic, sedative, and antiviral properties (Aguilar et al., 1994; INI, 1994). A cyclic hexapeptide isolated from this plant with antitumor activity was reported by Shivanand et al. (1977), and ursolic and oleanolic acid with attributed hypoglycemic activity are present in this species (Pérez et al., 1998). *Vitex mollis* HBK (Verbenaceae) is a medium-sized tree (growth 15 m in height) found in the western region of Mexico comprised by the states of Oaxaca, Guerrero, Morelos, Michoacan, and Jalisco. It is widely used against scorpion stings; however, no pharmacologic studies justifying its application have been carried out (Baytelman, 1980).

The aim of this work was to evaluate the effect of *B. ternifolia*, *A. elegans* and *V. mollis* extracts on *C. limpidus limpidus* venom lethality in mice and to determine their antagonist activity on guinea pig ileum contraction.

Materials and methods

Plant material

With the support of professional collectors, the roots of *B. ternifolia* Schltdl (HPMIMSS13596) were collected from the town of Coajomulco, Morelos, while roots of *A. elegans* Mast (HPMIMSS13595) were obtained from the eastern region of the state of Guerrero, and *V. mollis* HBK (HPMIMSS12050) leaves were obtained from Oaxtepec, Morelos. All materials were identified by Abigail Aguilar-Contreras, MSc, the IMSS Herbarium Director. Voucher specimens were stored at this site for future reference.

Extract preparation

The leaves from *V. mollis* and roots from *B. ternifolia* and *A. elegans* were dried under dark conditions at room temperature. The dried material was individually processed; subsequently, an exhaustive extraction was performed by percolation with *n*-hexane, and then with methanol. The yield extract was quantified and the materials obtained were protected from light and stored under refrigeration between 0 and 4°C until experimentation.

C. limpidus limpidus venom preparation

Scorpion venom was obtained from a colony of scorpions grown and maintained at our laboratory in Xochitepec. The venom was collected in a glass dish by an electric pulse administered directly on the telson. The material obtained was clarified by centrifugation, then freeze-dried and stored at –70 °C until use. The venom was always dissolved in saline isotonic solution for use.

Animals

Balb-C mice (20–22 g) and Hartley guinea pig (350–450 g) were used. All were obtained from our Bioterium, maintained under laboratory conditions at 22±2°C with 12-h light-dark cycle and ad libitum access to food and water.

Plant lethality test

The lethal effect of plant extracts was determined. Five groups of six mice were used; each group was treated with a single dose (growing doses) of extract at a final volume of 0.5 ml administered intravenously (i.v.) in mice through the caudal vein. Mortality was evaluated 24 h post-injection.

57

59

61

63

65

67

69

71

73

75

77

79

81

83

85

87

89

91

93

95

97

99

101

103

105

107

109

111

Antitoxin in vivo test

Five groups of six mice of either sex were used. All groups were treated with different growing venom doses (0.69–1.2 mg/kg) in a total volume of 0.5 ml. Dried plant extract were dissolved in saline isotonic solution and administered simultaneously with the venom via caudal vein in a final dose of 50 mg/kg. Another five groups of six mice each solely received the same venom doses, thus serving as the control group. Mortality was determined 24 h post-inoculation.

Antagonism in vitro test

Guinea pigs were sacrificed by a blow to the neck; the distal ileum was obtained by laparotomy. The tissue obtained was carefully washed with Tyrode solution; a 2 cm section was dissected and placed in an incubation chamber. The tissue was affixed at the bottom of the chamber by means of a silk thread, while the other side of this tissue was tied with the same thread via a force transducer, which was connected to an analogous digital-acquisition solution (Maclab 8). The tissue was maintained with 1 g of tension at 37 °C in Tyrode solution (NaCl 136.9 mM, glucose 11.1 mM, NaHCO₃ 11.9 mM, CaCl₂ 1.4 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaH₂PO₄ 0.4 mM, pH 7.4) and bubbled with a mixture of CO₂ 5% and O₂ 95%. After a period of adaptation, acetylcholine (Sigma) solution (1 × 10⁻⁴ M final concentration) was added, considered as 100% of the contraction and used for reference of contraction. After washing, the tissue was recuperated and, by adding the venom solution, concentration-dependent curves were constructed (0.2–16 µg/ml). Finally, the plant extracts were added to the chamber in different concentrations and their effect was determined on the concentration response curves.

Statistics

In vivo assays were analyzed by analysis of variance and the test groups were compared with control by Student *t* test. The probability of 0.01 or less was considered as significant.

Results

In the plant lethality test, all plant extracts used in this work showed an LD₅₀ higher than 120 mg/kg of body weight i.v.

The yield of hexane extraction was 1.1% *V. mollis*, 0.57% *A. elegans*, and 0.83% *B. ternifolia*; methanol extracts were 10.2%, 5.5%, and 8.3%, respectively.

The LD₅₀ by i.v. administration of *C. limpidus limpidus* venom was 0.750 ± 0.08 mg/kg. When *B. ternifolia* hexane extract was administered simultaneously with the venom, the LD₅₀ was modified to 1.64 ± 0.19, while the administration of the methanol extract of the same species produced a LD₅₀ of 1.16 ± 0.14 mg/kg. Both results were statistically different (*p* < 0.004) with Student *t* test analysis. The extracts of *A. elegans* showed lower antitoxic activity; administration of methanol extract of this plant produced an increase in LD₅₀ to the venom to 0.984 ± 0.06 mg/kg, while the hexane extract increased the value to 1.04 mg/kg, the latter case without statistical significance. Methanol and hexane extracts from *V. mollis* did not show any protection against scorpion poisoning. Results from the antitoxin in vivo assay are illustrated in Fig. 1.

Fig. 2 shows the recording in real time of isolated guinea pig ileum force and movement. Under rest conditions, the addition of *C. limpidus limpidus* venom induced a sustained tissue contraction that could last up to 6 or 7 min. Subsequently, low-force repetitive contractions were observed. After contraction, the tissue cannot be stimulated by acetylcholine pulse (data not shown). Ileum contraction induced by venom was reversed by the addition of the extracts from *B. ternifolia* and *A. elegans*. As shown in Fig. 2, the contraction was strongly inhibited, reaching an effect of 70%. On the other hand, inhibition produced by the addition of extracts from *V. mollis* was 25%. As illustrated in Fig. 3, the effect produced by the extracts from *A. elegans* and *B. ternifolia* was concentration-dependent. The inhibition effects began when the extract concentration of 80 and 40 µg/ml, respectively, were added, reaching a maximum inhibition of 70%.

Discussion

Dehesa-Dávila et al. (1995) reported that the LD₅₀ of *C. limpidus limpidus* venom in mice depends on the mouse strain: it is usually between 0.61 and 3.0 mg/kg, while in our work, we obtained an LD₅₀ value in mice of 0.75 ± 0.088 mg/kg. This supports the idea that the venom utilized in our experiments contained a sufficient concentration of specific toxins against mammals. In general, our results demonstrated the effectiveness of the plant extracts from *B. ternifolia* and *A. elegans* for modifying the lethality of *C. limpidus limpidus* venom in mice. Hexane extract from *B. ternifolia* showed to be the more potent, reaching a 2.2 times LD₅₀ modification. This effect could not be compared with the specific antiserum, in which LD₅₀ is increased approximately 150 times. Nevertheless, the hexane extract contains a great variety of compounds, and it is possible to increase effectiveness after phytochemical separation of the

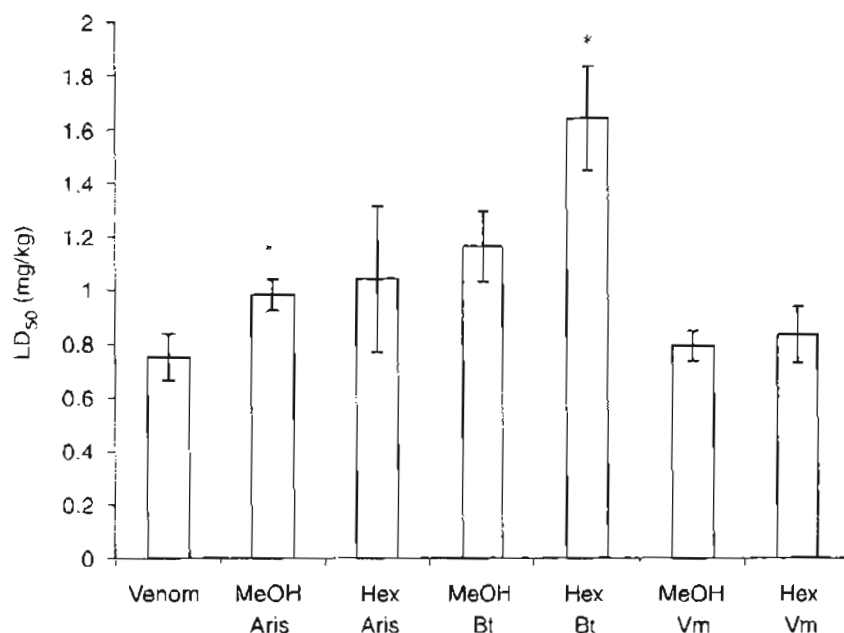


Fig. 1. LD₅₀ produced by the administration (i.v.) of *C. limpidus limpidus* venom on mice and modified by the simultaneous administration of hexane (hex), and methanol (MeOH) extract of *A. elegans* (Aris), *B. ternifolia* (Bt) and *V. mollis* (Vm). * is $p < 0.01$ on "t" student test.

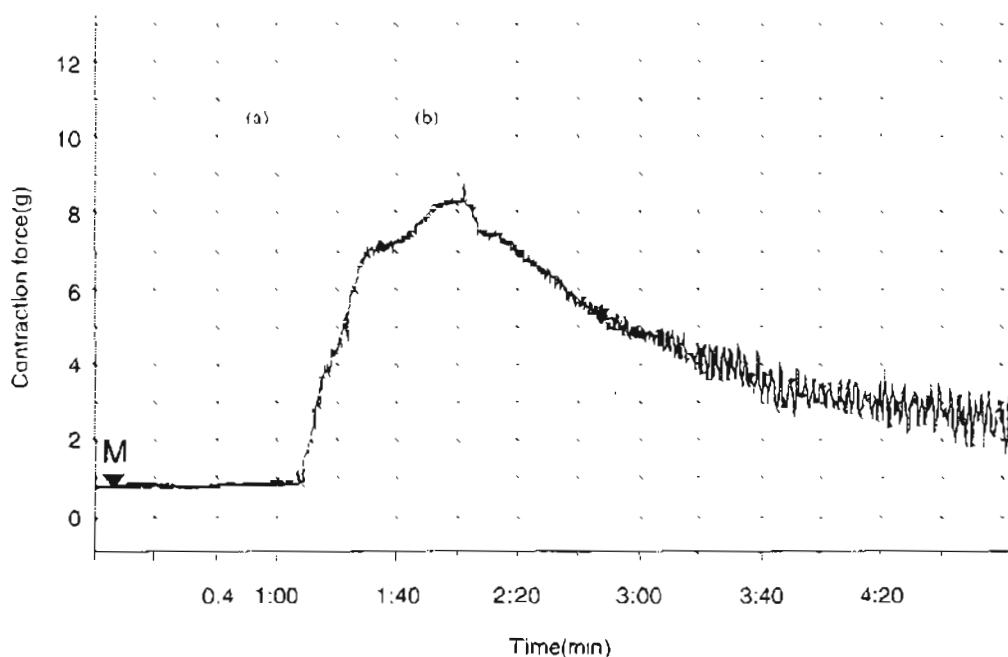


Fig. 2. Recording showing the force and movement of the isolated guinea pig ileum and the effect produced by the addition of 14 μ g/ml of *C. limpidus limpidus* venom (a), and 150 μ g/ml of methanol extract from *A. elegans* (b).

active compounds. Similar results were obtained with the hexane extract from *A. elegans*, which was able to increase the LD₅₀ 1.38 times. The guinea pig ileum contraction induction produced by venom from other

scorpions has already been reported by Matos et al (1999). Normally, the venom creates a reproducible and sustained contraction, with a significant elevation of baseline tension with frequent and periodic super-

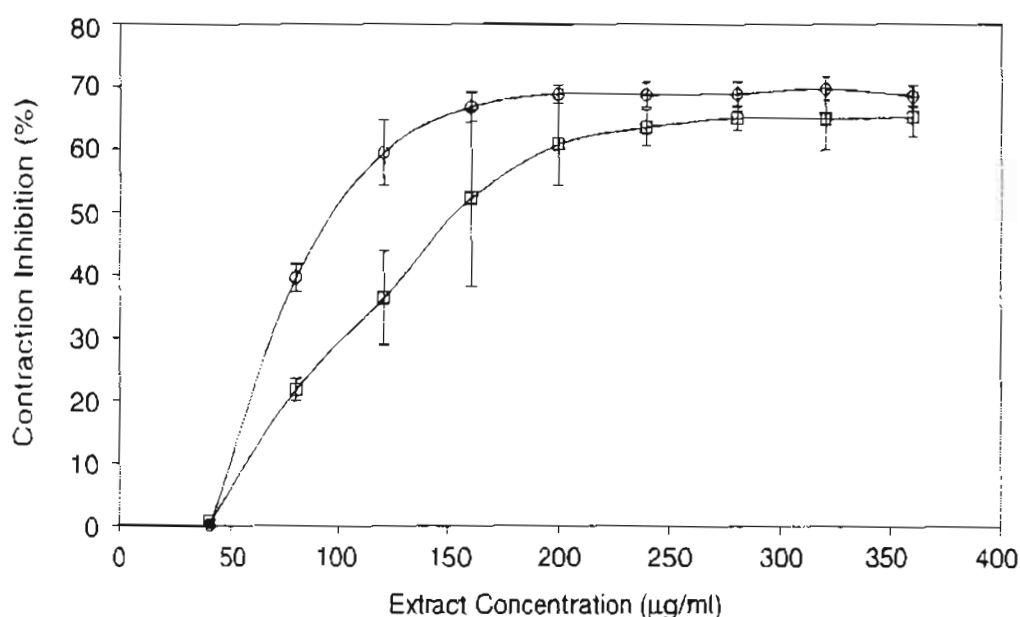


Fig. 3. Inhibition produced by addition of different concentrations of hexane extracts from *A. elegans* (□) and *B. ternifolia* (○) on contractions induced by 14 µg/ml of *C. limpidus limpidus* venom on the isolated guinea pig ileum. Each dot is the mean and s.d. of five observations.

imposed contractions on the elevated baseline. The authors attribute this behavior of the isolated tissue to the initial release of acetylcholine and the participation of the substance P. In our experiments on isolated guinea pig ileum, we found the activity pattern when the *C. limpidus limpidus* venom was added. With the addition of both, *B. ternifolia* and *A. elegans* hexane extracts, the contraction produced by venom was inhibited in a dose-dependent manner, reaching an inhibition of 70%. Subsequently, periodic and rhythmic superimposed contractions were eliminated. *C. limpidus limpidus* venom toxicity resides in three specific neurotoxins that recognize the sodium channel classified as type β (Lebreton et al., 1994; Ramirez et al., 1988), and a specific potassium channel (Martin et al., 1994). β toxin interaction with Na^+ channel is produced through its union to the four sites on the channel, which is voltage-independent, and affects channel activation (Jover et al., 1980; Catterall, 1986) with an increment of Na^+ conductance. With respect to the potassium channel, the specific toxin has a concentration of <0.1% in relation to other toxins. Only *C. noxius* venom has been described as a toxin-specific potassium channel that affects humans (Olamendi-Portugal et al., 1996; Nieto et al., 1996). The increment in sodium channel conductance produces acetylcholine and adrenaline release, which could explain the majority of clinical manifestations in scorpion poisoning (Montoya-Cabrera, 1996).

Scorpion venom produces complex physiopathologic pattern, attributed to a massive release of neurotransmitters, principally acetylcholine and catecholamines (Ismail, 1995). On critical patients, inflammatory events in the pancreas and lung have also been described (D'Suze et al., 1999; Matos et al., 1997; Gallagher et al., 1981; Possani et al., 1991). The decrease of *C. limpidus limpidus* venom toxicity produced by the administration of hexane and methanol extracts from *A. elegans* and *B. ternifolia* could be attributed to the presence of different compounds identified in both plants.

The presence of at least 29 chemical compounds has been reported in roots from *A. elegans* (Vila et al., 1997). Between them, borneol and bornyl acetate could be of relatively greater importance because they antagonize the acetylcholine effect on the suprarenal medulla (Park et al., 2003; Tachikawa et al., 2000), probably inhibiting the massive release of catecholamines, which is one of the unchaining factors of the symptomatology of patients suffering from scorpion sting. The effect of these compounds, plus the activity of β -pinene, which has demonstrated relaxing activity on guinea pig isolated ileum (Sadrai et al., 2001), could explain the antagonistic effect of the *A. elegans* extract (Fig. 2) upon the contraction induced by the scorpion venom in this tissue.

Other compounds identified in the roots of *A. elegans* have shown anti-inflammatory activity (Vila et al., 1997), and could be involved in the effect produced by the extract utilized: δ -cadinene, 1,8-cineole, magnoflor-

me. α -pinene, β -caryophyllene, β -sitosterol (El-Sebakhy and Waterman, 1984) and aristolochic acid (Lenfeld et al., 1986; Santos and Rao, 2000, 2001; Juergens et al., 1998; Kupeli et al., 2002; Martin et al., 1993; Kuhnt et al., 1993; Mors et al., 2000). The latter exerts its anti-inflammatory activity inhibiting the phospholipase A₂ (Vishwanath et al., 1987), the activation of which produces the release of inflammatory substances derived from the hydrolysis of phospholipids. It is important to mention that other compounds identified in the roots from *A. elegans* have shown vasorelaxing activity: magnoflorine (El-Sebakhy and Waterman, 1984; Sotnikova et al., 1997) and 1,8-cineole (Vila et al., 1997; Lahlou et al., 2002).

The extracts from *B. ternifolia* contain ursolic and oleanolic acid (Pérez et al., 1998), which possess anti-inflammatory activity (Liu, 1995), and could be involved in the antitoxin activity of this plant.

The traditional preparation of *A. elegans* and *B. ternifolia* remedies is basically the decoction of roots. Although our study utilized a different extraction and administration route, it can be assumed that the chemical content of the aqueous extracts is similar to the organic extracts utilized in this study, because the water ebullition facilitates the suspension of non-polar compounds in aqueous medium. On the other hand, there are compounds that facilitate absorption by themselves. It has been reported that the mixture of 1,8-cineole, α -pinene and β -pinene could increase the permeability to compounds in drastic conditions of absorption (Huang et al., 1999). This study shows the antitoxin effect of the *A. elegans* and *B. ternifolia* extracts on scorpion poisoning; nevertheless, it does not justify the use of these products as first election therapy.

References

- Abroug, F., El-Atrous, S., Nour, S., Haguga, H., Touzi, N., Bouchoucha, S., 1999. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomized controlled trial. *Lancet* 354, 906–909.
- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jacquez-Lopez, M.E., 1994. *Herbario Medicinal de Instituto Mexicano del Seguro Social*, México, pp. 176–177.
- Baytelman, G.B., 1980. Etnobotánica en el Estado de Morelos. Metodología e introducción al estudio de 50 plantas medicinales de la zona norte del Estado de Morelos. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México, p. 280.
- Calderon-Aranda, E.S., Hozbor, D., Possani, L.D., 1993. Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. *Toxicon* 31, 327–337.
- Catterall, W.A., 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channel. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 953–985.
- Dehesa-Dávila, M., 1986. Avances en el tratamiento farmacológico de la picadura de alacrán. *Salud Pub. Mex.* 28, 83–91.
- Dehesa-Dávila, M., Alagón, A., Possani, L.D., 1995. Clinical toxicology of scorpion sting. In: Julian White, Jürg Meir (Ed.), *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 221–238.
- D'Suze, G., Comellas, A., Pesce, L., Sevcik, C., Sánchez de León, R., 1999. *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37, 173–180.
- El-Sebakhy, N., Waterman, P.G., 1984. (-)-(R,R)-7'-O-methylcuspidaline from the leaves of *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* 23, 2706–2707.
- Gallagher, S., Sankaran, H., Williams, J.A., 1981. Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas. *Gastroenterology* 80, 970–973.
- Hernández, F., 1969. Obras completas tomo III. Historia Natural de la Nueva España. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Huang, Y.B., Fang, J.Y., Hung, C.H., Wu, P.C., Tsai, Y.H., 1999. Cyclic monoterpene extract from cardamom oil as a skin permeation enhancer for indometacin: in vitro and in vivo studies. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 642–646.
- Hutt, M.J., Houghton, P.J., 1998. A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. *J. Ethnopharmacol.* 60, 97–100.
- Instituto Nacional Indigenista (INI), 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Ed. México, Vol II, III, pp. 537–538, 691, 1362–1363.
- Ismail, M., 1995. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33, 825–858.
- Jover, E., Couraud, E., Rochat, H., 1980. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1607–1614.
- Juergens, U.R., Sober, M., Schmidt-Schilling, L., Kleuver, T., Vetter, H., 1998. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma. inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *Eur. J. Med. Res.* 17, 407–412.
- Kuhnt, M., Probstle, A., Rimpler, H., Bauer, R., Heinrich, M., 1993. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Med.* 59, 533–536.
- Kupeli, E., Kosar, M., Yesilada, E., Husnu, K., Baser, C., 2002. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effect of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish berberis species. *Life Sci.* 72, 645–657.
- Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhaes, P.J., Leal-Cardoso, J.H., 2002. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oil, in normotensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 1125–1131.
- Lebreton, F., Delepiere, M., Ramirez, A.N., Balderas, C., Possani, L.D., 1994. Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Biochemistry* 33, 11135–11149.

- Lenfeld, J., Motl, O., Trka, A., 1986. Anti-inflammatory activity of extracts from *Conyza canadensis*. *Pharmazie* 41, 268–269.
- Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49, 57–68.
- Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J.R., 1987. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Rev. Med. IMSS* 25, 283–291.
- Martín, S., Padilla, E., Ocete, M.A., Galvez, J., Jiménez, J., Zarzuelo, A., 1993. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. *Planta Med.* 59, 533–536.
- Martín, B.M., Ramírez, A.N., Gurrola, G.B., Nobile, M., Prestipino, G., Possani, L.D., 1994. Novel K(+) channel-blocking toxins from the venom of scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. *Karsch. Biochem. J.* 304, 51–56.
- Matos, I.M., Rocha, O.A., Leite, R., Freire-Maia, L., 1997. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rat. *Biochem. Physiol.* 118C, 143–148.
- Matos, I.M., Teixeira, M.M., Leite, R., Freire-Maia, L., 1999. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 368, 231–236.
- Montoya-Cabrera, M.A., 1996. Alacranismo. *Gac. Med. Mex.* 132, 645–648.
- Mors, W.B., DoNascimento, M.C., Ruppelt-Pereira, B.M., Pereira, N.A., 2000. Plant natural products active against snake bite—the molecular approach. *Phytochemistry* 55, 627–642.
- Nieto, A., Gurrola, G., Vaca, L., Possani, L.D., 1996. Noxiustoxin 2, a novel K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 34, 913–922.
- Olamendi-Portugal, T., Gómez-Lagunas, F., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1996. A novel structural class of K⁺ channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* 315, 977–981.
- Park, T.J., Park, Y.S., Lee, T.G., Ha, H., Kim, K.T., 2003. Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol. *Biochem. Pharmacol.* 65, 83–90.
- Pérez, G.R.M., Pérez, G.C., Pérez, G.S., Zavala, S., 1998. Effect of interpenoids of *Bouvardia ternifolia* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phyto-medicine* 5, 475–478.
- Possani, L.D., Martín, B.M., Fletcher, M.D., Fletcher, P.L., 1991. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxin purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266, 3178–3185.
- Ramírez, A.N., Martín, B.M., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1988. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. *Karsch. Toxicon* 32, 479–490.
- Rastrelli, L., Capasso, A., Pizzi, C., De Tommasi, N., 1997. New protopine and benzyltetrahydroprotoberberine alkaloids from *Aristolochia constricta* and their activity on isolated guinea-pig ileum. *J. Nat. Prod.* 60, 1065–1069.
- Sadrai, H., Asghari, G.R., Hajhashemi, V., Kolagar, A., Ebrahimi, M., 2001. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula humosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine* 8, 370–376.
- Santos, F.A., Rao, V.S., 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother. Res.* 14, 240–244.
- Santos, F.A., Rao, V.S., 2001. 1,8-cineole a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury rats. *Dig. Dis. Sci.* 46, 331–337.
- Shivanand, D., Hoffman, J.J., Torrence, S.J., Wiedhopf, R.M., Cole, J.R., Arora, S.K., Bates, R.B., Gargiulo, R.L., Krick, G.R., 1977. Bouvardin y deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8040–8044.
- Sotnikova, R., Kettmann, V., Kostalova, D., Taborska, E., 1997. Relaxant properties of some aporphine alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 19, 589–597.
- Tachikawa, E., Takahashi, M., Kashimoto, T., 2000. Effects of extracts and ingredients isolated from *Magnolia obovata* Thunberg on catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* 60, 433–440.
- Vila, R., Mundina, M., Muschietti, L., Priestap, H., Bandoni, A.L., Adzet, T., Cañiguala, S., 1997. Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* 46, 1127–1129.
- Vishwanath, B.S., Appu Rao, A.G., Gowda, T.V., 1987. Interaction of phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom with aristolochic acid: a circular dichroism study. *Toxicon* 25, 939–946.



The secretagogue effect of the poison from *Centruroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and the antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia* extract

E. Jiménez-Ferrer, I. Reynosa-Zapata, Y. Pérez-Torres, J. Tortoriello*

Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina 1, Xochitepec, Morelos 62790 México

Received 24 April 2003; accepted 30 May 2004

Abstract

In Mexican traditional medicine the plant species *Bouvardia ternifolia* is used as remedy to treat patients who have been stung by scorpions. In the preceding study, the methanol extract from the roots of this plant was capable of reducing the poisonous effect of *Centruroides limpidus limpidus* on mice. The poisoning from scorpion *C. limpidus limpidus* includes manifestations associated with the pancreatitis. This study evaluated the effect produced by the hexane and methanol extract from the root of *B. ternifolia* upon the acutely inflamed pancreas induced by the venom of *C. limpidus limpidus* on rats, and the release of amylase in the isolated pancreas of mice. The intravenous administration of venom induced the extravasation of labelled albumin, in a dose dependant manner. The pre-administration of both extracts of *Bouvardia ternifolia* reduced significantly ($p < 0.05$) the extravasation by 60%. Upon measuring the secretagogue effect of the venom in the isolated pancreas of mice, the EC_{50} of the venom was $3.76 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$, whilst in the presence of the methanol and hexane extracts, this EC_{50} was $9.13 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$ and $0.01629 \text{ mg ml}^{-1}$. In conclusion, the *C. limpidus limpidus* venom possesses a secretagogue effect of amylase on the pancreas of mice and produces an inflamed pancreas which is effectively antagonised by the hexane and methanol extracts from the roots of *B. ternifolia*.

© 2004 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Bouvardia ternifolia*; *Centruroides limpidus limpidus*; Pancreatitis; Amylase; Albumin; Antagonization by *Bouvardia ternifolia* extract

Introduction

In the central-southern region of Mexico, especially in the states of Morelos and Guerrero, there is a high incidence of poisonous scorpion stings (Dehesa-Dávila et al., 1995). In the majority of cases, the species responsible for such poisonings is the *Centruroides*

limpidus limpidus, whose venom possesses three toxins, specifically for mammals, which are directed against the fourth site of the voltage-gated sodium channel. These have been classified as toxins type β , which modify the kinetic activation of the Na^+ channel and produce a persistent stimulation of the nerve cells (Lebreton et al., 1994; Ramirez et al., 1988). They provoke a massive release of catecholamines, such as acetylcholine, which finally explains the physiopathological pattern associated with the poisoning (Montoya-Cabrera, 1996).

*Corresponding author. Tel./fax: +777-361-2155

E-mail address: j.tortora2@yahoo.es (J. Tortoriello).

It has been reported that scorpion venom stimulates the release of amylase in the pancreas lobes of guinea pigs, in a similar way with how carbamylcholine is produced, and this effect is blocked specifically by atropine and tetrodotoxin. In isolated acinar pancreatic cells, the carbamylcholine provokes the release of amylase but the venom shows no effect (Matos et al., 1999). This may be due to the fact that the acinar pancreatic cells have no Na^+ voltage-gated channels. Only two types of ionic channels have been identified, one non-selective (permeable to K^+) activated by Ca^{2+} and a K^+ channel activated by Ca^{2+} . On the other hand, in insular cells there are Na^+ voltage-gated channels (Possani et al., 1991).

The clinical pattern of poisoning from a *C. limpidus limpidus* scorpion sting includes diverse manifestations associated with acute pancreatitis such as epigastrium pain and vomiting, which, when present, are considered as serious symptoms. A while ago it was demonstrated that the toxins from the scorpions of the *Tityus* genus possess a powerful secretagogue effect on the pancreas (Gallagher et al., 1981; Possani et al., 1991; Fletcher et al., 1994). However, there is no experimental evidence which shows that scorpion venom from the *C. limpidus limpidus* provokes acute inflammation of the pancreas.

B. ternifolia is a shrub from the Rubiaceae family, which grows in the caducifolio woods in central Mexico. In the states of Morelos and Puebla, they use an infusion made from the stems and leaves of this plant as a remedy in the treatment of patients who have been stung by scorpions. In a previous study, our group demonstrated how a methanol extract from the roots of this plant is capable of reducing the poisonous lethality of the venom from the *C. limpidus limpidus* on mice (Jiménez-Ferrer and Tortonello, 1999).

The objective of this study was to evaluate the antagonistic effect of the methanol and hexane extracts from the roots of *B. ternifolia* upon the acute inflammation of the pancreas induced by the *C. limpidus limpidus* venom on rats and on the release of amylase induced by the same venom on the mouse isolated pancreas.

Materials and methods

Plant material

B. ternifolia (Cav.) Schlechter (Rubiaceae) was collected in Coajomulco, Morelos, Mexico. The plant was authenticated by Dr. Abigail Aguilar-Contreras at the IMSSM herbarium where voucher samples, with the number HPMIMSS13596 were deposited for reference.

Extract preparation

Roots were selected and dried in dark conditions at room temperature. Dried and milled material was extracted exhaustively by percolation in hexane and then with methanol. Both extracts were evaporated to dryness under vacuum, stored at $0-4^\circ\text{C}$ and protected from direct light until experimental tests.

Preparation of the *Centruroides limpidus limpidus* venom

The venom was obtained from a colony of scorpions which were reared and kept in our laboratory. The venom was collected in a Petri dish, through an electric pulse applied directly to the telson of the animals. The material obtained was purified by centrifuge, then lyophilized and stored at -70°C , until used. For evaluation, the venom was always dissolved in a saline isotonic solution.

Animals

Mice from the Balb-C (20–22 g) strain and Sprague-Dawley rats (200–250 g) were used. All of the animals were obtained from our biothemo, where they were kept under controlled temperature conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and light with a time cycle of 12 h light-darkness and with free access to food and water.

Neurogenic inflammation of the pancreas and toxic effect of the venom of *C. limpidus limpidus* on rats, evaluated by the extravasation method of Evans blue

This procedure is based on the method described by Saria and Lundberg, (1983). Evans blue (EB), administered i.v. on the rats, links onto the serum albumin and is retained in the vascular compartment. Upon forming discontinuous gaps in the endothelial barrier, big enough to allow the extravasation of albumin, the EB flows to the interstice and can then be quantified in the tissue. In this experiment, the EB (30 mg kg^{-1} , in a solution of 3% NaCl 0.9%) was administered through the femoral vein in rats that had previously been anaesthetised (pentobarbital sodium, 40 mg kg^{-1} , i.p.). Fifteen minutes later (in groups of 3–5 animals per experiment) different doses of *C. limpidus limpidus* venom (1, 20, 100, $500\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$, i.p.) were administered. The animals remained in this condition for an hour, at the end of which, all the animals were perfused intracardiac via with 50 ml of saline phosphate buffer which contained 100 units ml^{-1} of heparin, followed by the administration of 200 ml of 1% paraformaldehyde in 500 mM of citrate buffer, pH 3.5. After perfusion, which permitted the elimination of blood and the flushing of

the vascular lumen, the pancreas was dissected by laparotomy. The pancreatic tissue obtained was incubated for 48 h in formamide, after which the extraction of the EB from the interstice was possible, which was quantified by measuring the optical density to 620 nm. With the aim of measuring the possible antagonistic effect produced by *B. ternifolia*, two groups of experimental treatment were treated i.p. before the administration of the EB, with a dose of 50 mg kg⁻¹ of the methanol and hexane extract of the plant.

Effect of *Bouvardia ternifolia* on the amylase release induced by the *C. limpidus limpidus* venom on the isolated mice pancreas

The pancreas was removed from anaesthetised mice (sodium pentobarbital, 40 mg kg⁻¹). Immediately after, the lobes were separated and the tissue was washed with a phosphate buffer solution 0.1 M and NaCl 0.15 M (PBS), pH 7.2. The pancreas was hung at the ends by silk thread calibre 2/0 in a 2 ml volume glass chamber. The tissue was kept in a Tyrode solution through continuous bubbling from a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂, at 37°C. It was washed on three occasions in the same solution and left for 15 min to stabilization. Once stabilized, different quantities of the *C. limpidus limpidus* venom (0.00032, 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg ml⁻¹) were added and samples were taken from the Tyrode (200 µl) solution after 5, 10 and 15 min. All the samples were immediately frozen at -20°C until the quantity of amylase was determined through the amyloclastic iodometric method. In order to determine the antagonistic effect of the hexane and methanol extracts from *B. ternifolia*, the concentration of the plant extract was adjusted to 0.039 mg ml⁻¹ in the perfusion chamber. The extract was applied 2 min before the scorpion venom.

Determination of amylase through the amyloclastic iodometric method

A phosphate buffer solution of 0.1 M, NaCl 0.15 M and pH 7.0 was used as a substrate, to which 250 µl of starch (0.5 µg ml⁻¹) were added. To this substrate, 5 µl of the problem sample were added and incubated at 37°C for 450 s. The reaction stopped during the addition of 250 µl of the iodine solution (0.1 N) in HCl (0.02 N). The product was diluted 1:10 with distilled water, and was then analysed by spectrophotometry to 640 nm and compared with a standard starch curve (Wiener Lab[®]).

Statistics

In vivo assays were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the test groups were compared with the

control by Student "t" test. The probability of 0.05 or less was considered as significant.

Results

Neurogenic inflammation of the pancreas and the toxic effect of the *C. limpidus limpidus* venom on rats

Acute pancreatitis is characterized by a massive edema of the pancreas and the adjacent retroperitoneal tissues. The edema is the result of an increase in the vascular permeability of plasmatic liquid. This process was monitored through the measurement of the extravasation of serum albumin (found in the pancreas interstice) labelled with EB, per gram in weight of fresh tissue. As Fig. 1 illustrates, the i.v. administration of the *C. limpidus limpidus* venom induced the extravasation of the labelled albumin. The edema produced from the scorpion venom showed a behaviour dependent on the dose. On this same model, the pre-treatment via i.p. with an extract, as much methanol as hexane, from the roots of *B. ternifolia* reduced the induced edema. This effect was most important when the highest dose of venom was administered (500 µg kg⁻¹), the extract was capable of significantly reducing ($p < 0.05$) the extravasation of the plasmatic liquid by approximately 60%. In this model the maximum effect was not established, due to

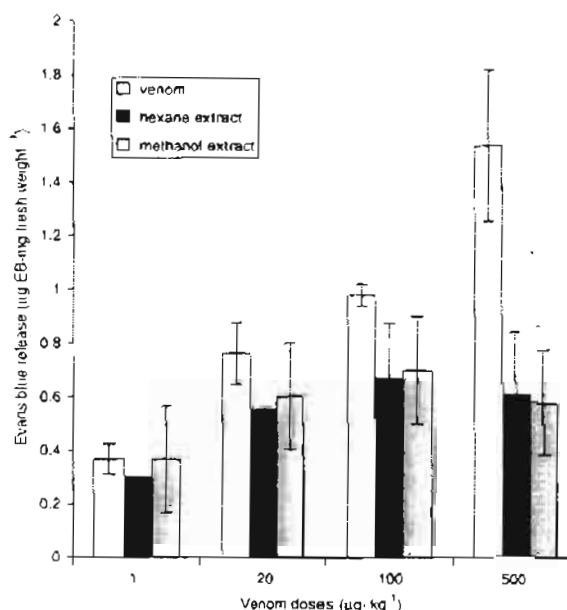


Fig. 1. Effect of the hexane and methanol extracts from the roots of *Bouvardia ternifolia* (50 mg kg⁻¹) on the extravasation of labelled albumin from the pancreas, induced by the i.v. administration of *C. limpidus limpidus* venom on rats. The results are averages $\pm$ standard deviation. $N = 3-5$ per group. $p > 0.05$ in the Student "t" test.

the fact that doses greater than $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ caused the death of the animal before the period of exposure to the venom had lapsed.

Effect of *Bouvardia ternifolia* on the amylase release induced by the *C. limpidus limpidus* venom on the isolated mice pancreas

With the purpose of measuring the secretagogue effect of scorpion venom on the isolated pancreas of mice, and the antagonism of the plant extracts through the enzymatic activity of amylase, it was first necessary to establish the effect produced by the plant extracts on the enzymatic kinetics of amylase. Under our experimental conditions, the following kinetic constants were established for amylase: $K_M = 68.56 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $V_{\max} = 15.47 \mu\text{g min}^{-1}$. In the presence of the hexane extract of *B. ternifolia*, the $V_{\max}$ weakened $\pm 8 \mu\text{g min}^{-1}$, obtaining a value of $V_{\max} = 8.025 \mu\text{g min}^{-1}$ and a $K_{Mapp} = 73.61 \mu\text{g ml}^{-1}$. With the methanol extract of *B. ternifolia*, the following was calculated: $V_{\max} = 11.39 \mu\text{g min}^{-1}$ and the $K_M = 68.75 \mu\text{g ml}^{-1}$. The kinetic constants obtained allowed the following inhibition constants to be established: $K_i = 0.0868$ and 0.03284 for the hexane and methanol extracts, respectively. In such a way that the percentages of inhibition (% i) were 36.45 for the hexane extract and 9.45 for the methanol extract.

As illustrated in Fig. 2, the venom from *C. limpidus limpidus* produced, with an effect dependent on the concentration, the release of amylase in the isolated pancreas of mice. The exposure of the pancreas tissue to the venom occurred in periods of 5, 10 and 20 min. The values of half-effective concentration (EC_{50}) between the 10 and 20 min periods did not present any significant

difference, whilst the incubation during the 5 min period was markedly less. Consequently, the tests to determine the antagonistic capacity of the hexane and methanol extracts of *B. ternifolia* were carried out using an exposure period to the venom of 10 min.

Fig. 3 shows the antagonistic capacity of the hexane and methanol extracts of *B. ternifolia* on the pancreatic discharge produced from the *C. limpidus limpidus* venom in the isolated pancreas of mice. The results indicate that the EC_{50} of venom (control condition) on the release of amylase was $3.76 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$. In the presence of the plant extracts, this EC_{50} was displaced by $9.13 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$ and $0.01629 \text{ mg ml}^{-1}$ with the hexane and methanol extracts respectively. Both extracts produced a considerable reduction in the maximum effect achieved by the venom, reaching an inhibition of $E_{\max}$ of 82% with the methanol extract and 88% with the hexane extract. However, upon applying the % i (on the enzyme activity of amylase) from the hexane and methanol extracts on the $E_{\max}$ of the venom (626.4 UA l^{-1}), we can consider that the $E_{\max}$ in the presence of the hexane extract (109.34 UA l^{-1}), a 36.45% corresponds to the inhibition of amylase once it has been released, whilst the $E_{\max}$ achieved in the presence of the methanol extract (84.64 UA l^{-1}), 9.45% corresponds to the inhibition of amylase. From this, we can calculate the real value of the antagonistic $E_{\max}$ on the secretagogue capacity of the *C. limpidus limpidus* poison in the isolated pancreas of mice from the *B. ternifolia* extracts, which result in a 297.8 and 135.8 UA l^{-1} , for the hexane and methanol extracts, respectively. These values correspond with the adjusted $E_{\max}$ and with this it was determined that the methanol extract was 1.2 times more capable than the hexane

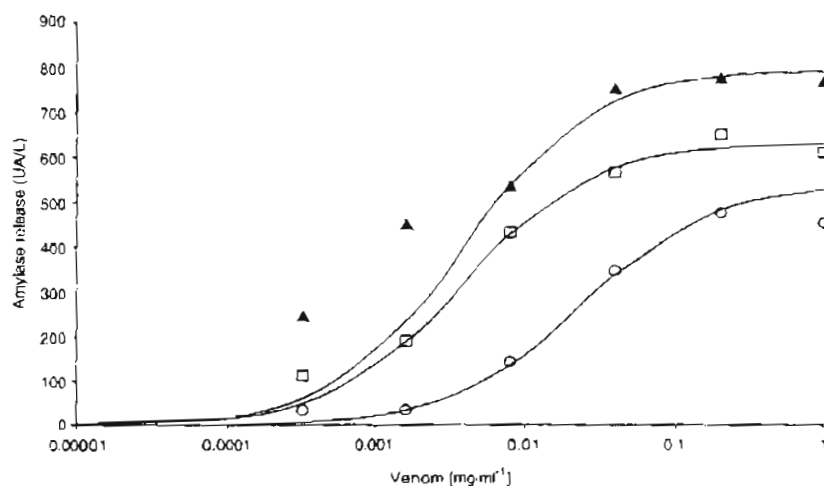


Fig. 2. Concentration-response curves of amylase release induced by the application of *C. limpidus limpidus* venom in the isolated mice pancreas. Effect of different times of exposure to the venom 5, 10 and 20 min (○, □ and ▲). The EC_{50} calculated are 0.023, 0.00376 and 0.0038 mg ml^{-1} in the same order.

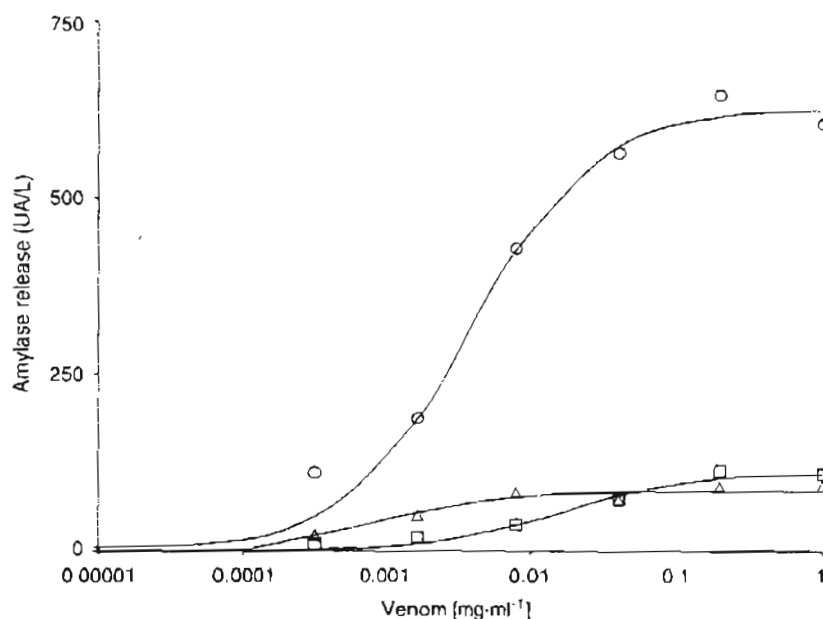


Fig. 3. Effect of the hexane and methanol extracts from the roots of *B. ternifolia* on the release of amylase induced by the *C. limpidus limpidus* venom, in the isolated pancreas of mice. The EC_{50} of venom alone (○) is: $0.000376 \text{ mg ml}^{-1}$; in the presence of the methanol (□) and hexane (△) extracts the values of EC_{50} are: 0.000913 and $0.01629 \text{ mg ml}^{-1}$, respectively.

extract in containing the discharge from the pancreas caused by the scorpion venom.

Discussion

The use of medicinal plants in cases of poisoning from scorpion stings is controversial; there have only been anecdotal reports confirming that some plants, such as *B. ternifolia*, reduce the strength of the poison. However, there are no clinical nor pharmacological reports which demonstrate the efficacy of such plants (Hutt and Houghton, 1998). The use of medicinal plants in the treatment of poisoning from venomous animals has been studied in greater depth for snakebite poisoning, as experiments have proven the presence of plant compounds which inhibit the hydrolytic enzymes of the snake venoms. An example is the aristolochic acid, a marking compound from the Aristolochiaceae family (Haruna and Choudhury, 1995).

In the case of scorpion venom poisoning, a more complex physiopathological pattern is unleashed. This is due to the fact that the target of the scorpion toxins is the Na^+ voltage-gated channel of the excitable cells, which provokes the massive release of acetylcholine and catecholamines which consequently act in different organs and produce a physiopathological pattern that is hard to counteract.

In a previous study, our group showed that the hexane and methanol extracts from *B. ternifolia* are

capable of reducing the strength of the *C. limpidus limpidus* venom by increasing the LD_{50} in mice from 0.712 mg kg^{-1} (i.v.) to 1.696 and 1.279 mg kg^{-1} , respectively (Jiménez-Ferrer and Tortoriello, 1999).

In the case of *Tytnus* and *Leirus* scorpion stings, the acute inflammation of the pancreas (secondary to the poisoning from scorpion stings) forms a fundamental part of the symptomatology of the poisoning. Nevertheless, until today, there has not been evidence if the *C. limpidus limpidus* venom provokes acute inflammation of the pancreas. According to the results obtained from the release test of EB, one can assume that poisoning with *C. limpidus limpidus* venom in rats produces acute edema of the pancreas with a behaviour dependant on the dose, which represents a considerable contribution towards the toxic characterisation of venom from this species of scorpion. On the other hand, the capacity of the hexane and methanol extracts of *B. ternifolia* to reduce the pancreas edema was evident when a dose of $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ was used. In this study the secretagogue capacity (of amylase in the isolated pancreas of mice) of *C. limpidus limpidus* venom was demonstrated, which, one can propose, was measured partially by the supraphysiological stimulation associated with the release of acetylcholine, as 40% (figures not shown) of the secretagogue activity was antagonized by atropine. The origin of the inflammatory process of the pancreas can probably be explained through the mediation of other substances.

In the pancreas edema associated with the scorpion venom, the substance P (SP) can play an important role

(Matos et al., 1999); the SP links onto the NK1-R receptors which are joined to G proteins from the endothelial cells and induce the formation of interruptions of the tissular continuity between the adjacent endothelial cells in the postcapillary venules (Boewden et al., 1994). The albumin and the fluids leave the vascular compartment through these gaps in the endothelial continuity towards the interstice resulting in an inflammatory edema. This explains the process observed in the model of pancreatitis generated by carulein which increases the vascular permeability. The results demonstrate that there is an extravasation of EB at the interstice provoked by the *C. limpidus limpidus* venom, which is widely accepted as a marker of disordered vascular permeability, associated with the inflammatory process. This inflammatory process was antagonized by both extracts obtained from *B. ternifolia*, which was in accordance with the capacity of these extracts to reduce the quantity of amylase released in the isolated pancreas of mice induced by scorpion venom.

In an evaluation of the pharmacological activity of a substance, the pharmacological effect is generally described in relation to the concentration of the substance, enabling to find a maximum effect when the system is saturated. However, in the model of the isolated mouse pancreas, it was observed that the antagonism of the extracts on the secretagogue effect of the venom, appeared masked by the inhibitory anti-amylase activity of the extracts. If we disregard the direct effect of the extracts on the enzyme activity of the amylase, we can see that the methanol extract was the most efficient for containing the discharge of the pancreas provoked by the exposure to the scorpion venom.

The antagonism of the extracts from *B. ternifolia* on the release of amylase provoked by carbamylcholine (results not shown), shows that part of the activity of the extracts is caused by an anti-cholinergic mechanism, however, it does not rule out that other pharmacological effects produced by other compounds present in the extracts might exist. All of the results allow us to conclude that the *C. limpidus limpidus* venom possesses a secretagogue effect of amylase on the pancreas of mice and produces an inflamed pancreas which is effectively antagonized by the hexane and methanol extracts from the roots of *B. ternifolia*.

The extracts of roots from *Bouvardia ternifolia* contain ursolic and oleanolic acid, which possess anti-inflammatory, analgesic, sedative and hepatoprotective activity (Liu, 1995). Regarding the acute pancreatitis, there could be different mechanisms through which these compounds counteract. The anti-inflammatory effect produced by ursolic and oleanolic acids is based on their ability of inhibiting the histamine release from the mast cells (Tsuruga et al., 1991). Normally, histamine increases the vascular permeability and

promote the edema associated to acute pancreatitis (Harvey et al., 1987; Dib et al., 2002); this fact could explain the capability of *B. ternifolia* extracts to antagonize the edema produced by the *C. limpidus limpidus* venom. On the other hand, the cyclooxygenase and lipoxygenase are two inflammatory enzymes, whose activation is fundamental for establishing the acute pancreatitis (Closa et al., 1993; Song et al., 2002). The ursolic and oleanolic acids also inhibit the cyclooxygenase and lipoxygenase, therefore they reduce the production of inflammatory mediators from the arachidonic acid (Liu, 1995). It has been demonstrated that the oleanolic acid inhibits the synthesis and release of prostaglandin E2 and leukotriene B (Simon et al., 1992; Zhou et al., 1993).

Pancreatitis releases proteolytic enzymes that produce auto-digestion of the pancreatic tissue, generating necrosis that constitutes one of the most severe complications of this illness (Yamaguchi et al., 1989). Both, ursolic and oleanolic acid inhibit the elastase, with a *K_i* very similar for both compounds (4.4 and 6.4 μ M, respectively) (Ying et al. 1991), this fact could explain the anti-toxic capability of the extract at pancreatic level.

On acute induced pancreatitis models, the increment of oxygen-free radicals increases the lipids peroxidation and constitutes a mechanism involved in the pancreatic edema (Nonaka et al., 1992). It has been reported that the oleanolic acid is a strong protector against the lipids peroxidation, while ursolic acid presents a lower capability to protect the heart and liver microsomes from peroxidation. But, the combination of both triterpenoids amplifies, in a significant form, the protection against lipids peroxidation (Balanehru and Nagarajan, 1992). According with the aforesaid we can suppose that the *B. ternifolia* extract has the ability to counteract the acute pancreatic inflammation produced by the *C. limpidus limpidus* venom intoxication, due to the multiple actions of the ursolic and oleanolic compounds

Acknowledgements

The financial support from Health Research Council of Mexican Institute of Social Security (FP-2001-031) is gratefully acknowledged

References

- Balanehru, S., Nagarajan, B., 1992. Intervention of adnamycin induced free radical damage. *Biochem. Int.* 28, 735-744.
- Boewden, J.J., Garland, A.M., Baluk, P., Lefevre, P., Grady, E.F., Vigna, S.R., Bunnett, N.W., McDonald, D.M., 1994. Direct observation of substance P-induced internalization of

- neurokinin 1 (NK1) receptors sites of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8964–8968.
- Closa, D., Rosello-Catafau, J., Hotter, G., Bulbena, O., Fernández-Cruz, L., Gelpi, E., 1993. Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism in sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats. *Prostaglandins* 45, 315–322.
- Dehesa-Dávila, M., Alagón, A., Lounival, D.P., 1995. Clinical toxicology of scorpion sting. In: Jürg Meir Julian White (Ed.), *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, USA, pp. 221–238.
- Dib, M., Zhao, X., Wang, X., Andersson, R., 2002. Mast cell contribute to early pancreatitis-induced systemic endothelial barrier dysfunction. *Pancreatol.* 2, 396–401.
- Fletcher, M., Possani, L.D., Fletcher Jr., P., 1994. Morphological studies by light and electron microscopy of pancreatic acinar cells under effect of *Tityus serrulatus* venom. *Cell Tissue Res* 278, 255–264.
- Gallagher, S., Sankaran, H., Williams, J.A., 1981. Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas. *Gastroenterology* 80, 970–973.
- Haruna, A., Choudhury, M., 1995. In vivo anti-snake venom activity of a furanoid diterpene from *Aristolochia albidu* Duch (Aristolochiaceae). *J. Pharm. Sci.* 57, 222–223.
- Harvey, M.H., Wedgwood, K.R., Reber, H.A., 1987. Vasoactive drugs, microvascular permeability, and hemorrhagic pancreatitis cats. *Gastroenterology* 93, 1296–1300.
- Hutt, M.J., Houghton, P.J., 1998. A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. *J. Ethnopharmacol.* 60, 97–100.
- Jiménez-Ferrer, E., Tortorello, J., 1999. Plantas medicinales mexicanas utilizadas en el tratamiento de la picadura de alacrán. 4^a Reunión Regional de Investigación Médica, Región Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social, 109.
- Lebreton, F., Delepiere, M., Ramirez, A.N., Balderas, C., Possani, L.D., 1994. Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Biochemistry* 33, 11135–11149.
- Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49, 57–68.
- Matos, I.M., Teixeira, M.M., Leite, R., Freire-Maia, L., 1999. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 368, 231–236.
- Montoya-Cabrera, M.A., 1996. Alacranismo. *Gac. Med. Mex.* 132, 645–648.
- Nonaka, A., Manabe, T., Kyogoku, T., Tamura, K., Tobe, T., 1992. Evidence for a role of free radicals by synthesized scavenger 2-octadecylascorbic acid, in cerulein-induced mouse acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 37, 274–279.
- Possani, L.D., Martín, B., Fletcher, M., Fletcher, P., 1991. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266, 3178–3185.
- Ramírez, A.N., Martín, B.M., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1988. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon* 32, 479–490.
- Saria, A., Lundberg, J.M., 1983. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J. Neurosci. Methods* 8, 41–49.
- Simon, A., Najid, A., Chulia, A.J., Delage, C., Rigaud, M., 1992. Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 1125, 68–72.
- Song, A.M., Bhagat, L., Singh, V.P., Van Acker, G.G., Steer, M.L., Saluja, A.K., 2002. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G1166–G1174.
- Tsuruga, T., Chun, Y.T., Ebizuka, Y., Sankawa, U., 1991. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron* inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 3276–3278.
- Yamaguchi, H., Kimura, T., Mimura, K., Nawata, H., 1989. Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 4, 565–571.
- Ying, Q.L., Rinehart, A.R., Simon, S.R., Cheronis, J.C., 1991. Inhibition of human leucocytes elastase by ursolic acid. *Biochem. J.* 277, 521–526.
- Zhou, C., Sun, X., Liu, W., Shi, H., Gao, H., Miao, Y., 1993. Effects of oleanolic acid on the immune complex allergic reaction and inflammation. *J. Clin. Pharm. Sci.* 2, 69–79.