



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

NEUTRALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES TÓXICAS Y
ENZIMÁTICAS DEL VENENO DE *BOTHROPS ATROX* POR EL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *UROSPATHA SAGITTIFOLIA*

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de grado:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ANTONIO LEONEL VERA PALACIOS

TUTOR: PhD. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA

Napo - Ecuador

2022

**DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y
RESPONSABILIDAD**

Yo, Antonio Leonel Vera Palacios con documento de identidad N° 1313243857 declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en Biotecnología absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 03 de junio de 2022

Firma

Antonio Leonel Vera Palacios
CI. 1313243857

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular titulado: “Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops atrox* por el extracto etanólico de *Urospatha sagittifolia*”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Antonio Leonel Vera Palacios bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 03 de junio de 2022

Firma:

PhD. José Rafael De Almeida
C.I: 1757448954

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a las tres personas más importantes de mi vida. A mi mamá, la Sra. Nancy Palacios por su todo su apoyo y amor durante toda mi vida. Sin sus consejos, sus cuidados, su educación no podría ser el ser humano que soy hoy. Te dedico este trabajo por ser el motor de mi existencia y la razón por la que me enfuerzo diariamente. Este trabajo, logro y título también son tuyos.

A mi papá Mag. Fernando Vera, por criarme como persona de bien y apoyarme durante mis años de colegio y escuela. Sé que estarías muy orgulloso por este logro. Y, por último, a mi hermano Ronny Vera. Te dedico este trabajo por ser parte fundamental en mi vida, por estar presente en mi proceso de recuperación y por darme nuevas oportunidades.

Los amo y los amaré siempre familia, son lo mejor que Dios y el universo me pudo dar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, el ser que me tiene aquí y que me regaló la oportunidad de conocer, colaborar y trabajar con personas maravillosas durante mi vida universitaria. Agradezco a toda mi familia, especialmente a mi prima Ing. Fernanda Vera, a mi primo Ing. Oscar Vera, a mi prima Sra. Mercedes Aldaz, a mi primo Sr. Jorge Zambrano, a mi primo Josué Vera, a mi tía Mag. María Vera, a mi tía Sra. Eulalia Vera, a mi madrina Lic. Concepción Vera y cada familiar que me apoyó económicamente, con sus oraciones y cuidados.

Agradezco enormemente a mi tutor, PhD. Rafael de Almeida, por la paciencia y dedicación durante todo mi proceso de formación y la realización de este trabajo. A compañeros de mi grupo de investigación: Josselin Hernández, Emilio Carbonelly, Francisco Mendoza y en especial a Juan Diego Sacoto, compañero y amigo colaboró conmigo durante todo este proceso.

Agradezco también a mis amistades y personas que me ayudaron en momentos difíciles: Sol Peña, Rossemay Sanmartín, , David Pazmiño, Alejandro Pinos y su familia, Mónica Peñafiel y Martín Hinojosa.

Expreso mis agradecimientos al personal médico y psicológico de la Universidad Ikiam, por todos estos años de seguimiento y apoyo, sin el cual no hubiera llegado hasta este punto. Especialmente quisiera agradecer a la Dra. Cristina Sánchez, a la Lic. Siulyn Ospina y a la Dra. Amanda Pereira por sus excelentes cuidados y consejos.

Expreso mis agradecimientos a la profesora PhD. María Cristina Peñuela, a las estudiantes Karla Vera y Omaira Urbina miembros del Grupo de Ecosistemas tropicales y cambio global de la Universidad Regional Amazónica Ikiam por su apoyo técnico. Agradezco al Dr. David Salazar y al INSPI por sus colaboraciones esenciales en la realización de este trabajo, y a todos los profesores y personas que marcaron un antes y después en mi vida académica y personal: PhD. Pablo Jarrín, PhD. Caroline Bacquet, PhD. Pablo Cisneros, PhD. Gabriela Salazar, PhD. Mariana Capparelli, PhD. Cecilia Rodríguez, MSc. Yeimy Rojas, MSc. Bety Vasco y PhD. Jorge Andrade.

TABLA DE CONTENIDO

Carátula.....	i
Declaración de Derecho de Autor.....	ii
Certificado de Dirección de Trabajo de Integración Curricular.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de contenido.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 <i>Bothrops atrox</i>	1
1.1.2 Mordedura y veneno de <i>Bothrops atrox</i>	2
1.1.3 Antivenenos: Tradicionales y enfoques alternativos	3
1.1.4 Terapia antiofídica herbal	5
1.1.5 <i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott	6
1.1.6 Fitoquímica de <i>U. sagittifolia</i> (Rudge) Schott.....	7
1.2 Planteamiento del problema.....	8
1.3 Justificación de la investigación	9
1.4 Objetivos de la investigación	10
1.4.1 General.....	10
1.4.2 Específicos	10
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	11
2.1 Venenos de <i>Bothrops atrox</i>	11
2.2 Material vegetal y preparación de extractos	11
2.3 Modelos animales	13
2.4 Perfil bioquímico del veneno	13
2.5 Ensayos de inhibición enzimática.....	14
2.5.1 Fosfolipasas A ₂	14
2.5.2 Serin proteinasas.....	14
2.5.3 Metaloproteinasas o actividad caseinolítica.....	15
2.6 Ensayos de actividad biológica	15
2.6.1 Edema	15
2.6.2 Hemorragia.....	15

2.6.3	Letalidad	16
2.7	Electroforesis con venenos incubados	16
2.8	Análisis estadísticos y gráficas.....	16
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS		17
3.1	Perfil bioquímico del pool de venenos	17
3.2	Ensayos de inhibición enzimática.....	18
3.2.1	Inhibición de fosfolipasas A ₂	18
3.2.2	Inhibición de serin proteinasas	18
3.2.3	Inhibición de metaloproteinasas	19
3.3	Pruebas de inhibición in vivo	20
3.3.1	Actividad antiinflamatoria.....	20
3.3.2	Actividad antihemorrágica	20
3.3.3	Aumento de la tasa de supervivencia (Letalidad)	21
3.4	Caracterización electroforética de venenos incubados con USet.....	22
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN		24
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		29
REFERENCIAS		30

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1-1. Fitoquímicos presentes en el extracto etanólicos de los tubérculos de <i>U. sagittifolia</i>	7
---	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-12. Ejemplar de <i>B. atrox</i> , principal serpiente responsable por accidentes en la Amazonia..	2
Figura 2-12. Tubérculo colectado de <i>U. sagittifolia</i> en la localidad de Puerto Misahuallí, Napo, Ecuador..	6
Figura 3-12. Mapa del sitio de recolección y muestreo de los ejemplares de <i>U. sagittifolia</i>	12
Figura 4-12. Herbario de <i>U. sagittifolia</i>	12
Figura 5-12. Perfil bioquímico del pool de <i>B. atrox</i>	17
Figura 6-12. Actividad fosfolipásica del pool de venenos de <i>B. atrox</i> comparada con la de los tratamientos USet.	18
Figura 7-12. Actividad de serin proteinasas del pool de venenos crudo de <i>B. atrox</i> y de los tratamientos derivados del extracto etanólico de <i>U. sagittifolia</i>	19
Figura 8-12. Actividad del pool de venenos de <i>B. atrox</i> y los tratamientos USet a diferentes razones veneno:extracto para la degradación de azocaseína.	19
Figura 9-12. Acción inhibitoria de los tratamientos USet en el efecto edematogénico del veneno de <i>B. atrox</i>	20
Figura 10-12. Áreas de los halos hemorrágicos producidos por el veneno y los tratamientos USet.	21
Figura 11-12. Porcentaje de supervivencia de los modelos animales sometidos a una dosis letal de veneno de <i>B. atrox</i> (crudo) y con los tratamientos USet.....	22
Figura 12-12. Gel SDS-PAGE muestra las bandas de las proteínas contenidas en el pool crudo de <i>B. atrox</i> (V) y los venenos incubados con extracto.	23

RESUMEN

La mordedura de serpiente es una enfermedad desatendida declarada por la OMS responsable de miles de personas fallecidas anualmente en el mundo, lo que también genera un importante número de discapacidades funcionales con significativas consecuencias económicas y sociales. El tratamiento de primera línea contra mordeduras es el antiveneno de proteínas heterólogas, mismo que puede presentar varios inconvenientes como reacciones adversas, difícil acceso en zonas rurales y baja eficacia contra efectos locales. Es por esto, que en los últimos años se han buscado nuevas estrategias complementarias, como el desarrollo de inhibidores enzimáticos, los cuales pueden ser abundantes en plantas comúnmente empleadas por comunidades afectadas por el envenenamiento por mordedura de serpientes. El siguiente estudio determinó la capacidad neutralizante del extracto etanólico de la planta amazónica, *Urospatha sagittifolia*, en las actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops atrox*, la serpiente con más prevalencia de mordeduras en el oriente ecuatoriano. Se caracterizó bioquímicamente el veneno y se realizaron ensayos enzimáticos para determinar las actividades de fosfolipasas A₂, serin proteinasas y metaloproteinasas. Adicionalmente se desarrollaron ensayos *in vivo* para caracterizar la inhibición de los efectos locales y sistémicos como la inflamación, hemorragia y letalidad. Se determinó que existe inhibición enzimática significativa de manera dosis dependiente en todos los tratamientos para las tres familias de toxinas. Esta inhibición enzimática se ve reflejada en los ensayos *in vivo*, donde existen reducciones considerables de edema y hemorragia con mejores resultados para las dosis más altas. El extracto aumentó considerablemente el tiempo de muerte de los ratones sometidos a dosis letales de veneno, logrando una supervivencia hasta del 75%. Colectivamente, estos hallazgos evidencian el potencial antiveneno de esta planta, la cual es fuente promisoría de inhibidores enzimáticos que pueden ser usados para el diseño de nuevas modalidades terapéuticas alternativas para la neutralización de las principales toxinas del veneno bothrópico y sus acciones farmacológicas.

Palabras clave: Amazonía, antivenenos, plantas, mordedura de serpiente, toxinas.

ABSTRACT

According to the WHO, snake bites are a neglected disease that kills thousands of people each year and causes a significant number of functional disabilities with significant economic and social consequences. Heterologous protein antivenoms are the first-line of treatment for snake bites, but they can cause allergic reactions, are hard to acquire in rural areas, and have low efficacy against local effects. As a result, new complementary strategies such as enzyme inhibitors, which may be abundant in plants commonly used by communities affected by snakebite envenoming, have been developed in recent years. This study aimed to determine the neutralizing capacity of the ethanolic extract of the Amazonian plant, *Urospatha sagittifolia*, against the toxic and enzymatic activities of *Bothrops atrox* venom, the specie with the most prevalence of envenoming in eastern Ecuador. The venom was biochemically characterized and enzymatic assays were performed to determine the activity of phospholipases A2, serine proteinases and metalloproteinases. *In vivo* tests were performed in order to describe the inhibition of local effects such as inflammation and hemorrhage. Lethality was also tested. There are significant enzyme activity reductions in all treatments for the three families of toxins studied. *In vivo* essays support *in vitro* analysis with substantial reductions in edema and hemorrhage with better outcomes at higher doses. The extract considerably increased the chances of survival of mice injected with lethal doses of venom, achieving survival up to 75%. These findings show that this plant has antivenom potential, and is a promising source of enzyme inhibitors that can be used to develop new alternative therapeutic strategies for neutralizing bothropic venom toxins and their pharmacological actions.

Keywords: Amazon, antivenom, enzymes, plants, snakebite, toxins.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Bothrops atrox*

B. atrox es una especie de serpiente venenosa de la familia Viperidae que se distribuye al este de los Andes en zonas tropicales como bosques húmedos montanos bajos, bosques tropicales deciduos, sabanas, bosques de galería, y bosques lluviosos. Los países en las que está presente son Perú, Bolivia, Guayana Francesa, Surinam, Colombia, Venezuela, Guyana, Brasil y Ecuador, donde habita en las zonas tropical oriental y subtropical oriental [1]. En Ecuador se ha reportado especímenes en las provincias de Orellana, Napo, Morona Santiago, Sucumbíos, Pastaza, y Zamora Chinchipe [2].

Tiene un cuerpo alargado y esbelto, en su cabeza presenta escamas. Los machos llegan a medir 1,25 metros de largo, pero las serpientes hembras superan su longitud alcanzando 1,55 metros. El tamaño de su cola es corta e independiente del sexo y como todas las especies de su género tiene una foseta termo receptora. Presenta una coloración brillante en el dorso de tono café o negra con manchas que son alternas, los adultos en su cola tienen una tonalidad café en bandas o en grandes manchas, en cambio las serpientes jóvenes tienen el extremo distal de color amarillo y se diferencia de otras especies por su peculiar iris de color café (Figura 1-12) [3].

Es una especie nocturna, pero también se ha reportado actividad durante el día. Principalmente usa el mecanismo de emboscada para atacar, gracias a su capacidad de detectar el calor. En las primeras etapas del desarrollo del individuo, se alimentan de presas pequeñas y ectotérmicas como sapos, ranas y otros anfibios y reptiles pequeños. Con mayor tamaño, estas serpientes cazan animales de sangre caliente como aves, roedores y otros animales de mayor tamaño [1]. Esta especie es ovovivípara y su temporada reproductiva es prolongada, sobre todo en Ecuador, donde abarca casi todo el año [2]. Estas especies alcanzan su etapa adulta a los 3 años.



Figura 1-12. Ejemplar de *B. atrox*, principal serpiente responsable por accidentes en la Amazonia. Esta una especie de víbora altamente venenosa que se encuentra en las tierras bajas tropicales del norte de Sudamérica, al este de los Andes. Fotografía tomada de The Reptile Database [4].

En Sudamérica y Centroamérica, ocurren 70000 mordeduras al año [5] son producidas por *B. atrox* en conjunto con *B. asper* y *B. jararaca* [6]. En la Amazonía ecuatoriana es la mayor causa de accidentes ofídicos y se ha registrado que es la causante de prácticamente todas las mordeduras en las tribus Waorani [7].

1.1.2 Mordedura y veneno de *Bothrops atrox*

El veneno de *B. atrox* es miotóxico, proteolítico, hemorrágico provocando dolores e inflamaciones a nivel local como edema, inflamación y necrosis, pero también puede desencadenar reacciones sistémicas que puede reducir los tiempos de coagulación, insuficiencia renal, hemorragia y hasta la muerte del individuo si no recibe atención médica en el tiempo adecuado [8]. Las principales familias de proteínas presentes en el veneno de *B. atrox* son las serin proteinasas que producen coagulopatía, metaloproteasas encargadas del efecto hemorrágico y fosfolipasas A₂ relacionadas con el edema y la miotoxicidad [9].

Estudios proteómicos de los venenos de esta especie de serpiente han sido llevado a cabo en Colombia [9], Brasil [9] y Ecuador [10] muestran que la mayor parte de los componentes de estos venenos son metaloenzimas, especialmente metaloproteinasas

PIII (PIII-SVMP) que presentan un dominio catalítico seguido de un dominio tipo desintegrina y un dominio rico en cisteína, y las metaloproteinasas PI (PI-SVMP) que solo contienen el dominio de metaloproteinasa. En Ecuador, los estudios demuestran que las PIII-SVMP and PI-SVMP son las toxinas predominantes, aunque su composición exacta es desconocida [10].

Guércio *et al.* [11], comparan el veneno de *B. atrox* en tres diferentes etapas de desarrollo (juveniles, subadultos y adultos), y sugieren que su proteoma se altera significativamente con el envejecimiento del animal, es decir, existe variación ontológica. Además, existe evidencia de variación intraespecífica del veneno por factores como variación geográfica y dieta de la serpiente [12,13].

1.1.3 Antivenenos: Tradicionales y enfoques alternativos

La terapia actual para el tratamiento de envenenamiento por serpientes es el antiveneno de proteínas heterólogas, que son anticuerpos generados a partir de la inmunización de animales como los caballos con cantidades subletales de veneno [14]. El antídoto puede ser policlonal (producido contra el veneno de muchas especies de serpientes) o monoclonal (desarrollado contra el veneno de una sola especie de serpiente), y los lotes de veneno varían mucho entre ubicación geográfica, sexo y edad [15]. Esta variabilidad contribuye a la aparición de efectos secundarios que pueden ser graves debidos a las reacciones cruzadas inmunológicas [16] y sus manifestaciones clínicas incluyen exantema, fiebre, malestar general, artralgia, artritis, anafilaxis y muerte [17].

Aparte de estos efectos secundarios, los antídotos por proteínas heterólogas no siempre son útiles contra los problemas que pueden surgir de una mordedura de serpiente. El antiveneno de proteínas heterólogas ha demostrado en algunos estudios ser ineficaz para el tratamiento de coagulopatías [18] y efectos locales como inflamación [19] y hemorragia [20], que son las complicaciones más comunes del envenenamiento por estas especies[21–23], y que causan importantes comorbilidades. Esto podría deberse a la rápida absorción de estos componentes del veneno [24] y al impedimento físico que tienen los anticuerpos para difundirse en tejidos como el músculo y la piel [25].

Además, dada la variación intraespecífica de los venenos, existen bajas tasas de neutralización en países donde la producción del antiveneno por proteínas heterólogas no es local y es polivalente [24]. Por ejemplo, el antiveneno elaborado para la víbora

Echis carinatus de la India se usó para tratar las mordeduras de la víbora *Echis ocellatus* de África occidental, íntimamente emparentadas. Estos antídotos resultaron ser muy ineficientes debido a la variación en los componentes de la toxinas, lo que resultó en tasas de letalidad del 12%, cuando con el antídoto adecuado eran menores al 2%. [26]. En el sur de Asia, el antiveneno elaborado con toxinas de la víbora *Daboia russellii* tiene poca potencia neutralizadora contra el veneno de las serpientes de la misma especie en Bangladesh, lo que sugiere que se puede requerir una dosis de tratamiento de cinco a diez veces la dosis de tratamiento estándar [27]. En América Latina, se realizó un estudio que sugiere que los antivenenos heterólogos BIOL (Argentina), UCV (Venezuela) e INS-PERU (Perú) pueden ser considerados como alternativas a los antivenenos homólogos colombianos INS-COL y PROBIOL, así como a los antivenenos ICP de Costa Rica para el tratamiento de los envenenamientos por *B. asper* en el occidente de Colombia y Ecuador, sin embargo, existen diferencias en el porcentaje de neutralización de cada uno [20]. Debido a esto, han nacido nuevos enfoques de tratamientos, como el uso de péptidos, inhibidores de moléculas pequeñas y la terapia herbal [24].

La idea de emplear péptidos para unir y neutralizar con precisión las principales toxinas que se encuentran en el veneno de serpiente es un enfoque prometedor. El uso de inhibidores de péptidos parece ser beneficioso ya que pueden ser selectivos para los componentes de la toxina que se encuentran en el veneno [28]. Inhibidores endógenos, que son inhibidores presentes en la circulación sanguínea de las serpientes venenosas [29], e inhibidores exógenos, que son inhibidores que se encuentran en la circulación sanguínea de otros animales [30]. Existen varios inhibidores endógenos de fosfolipasa y metaloproteasa se secretan para la autoprotección de la serpiente de su propio veneno [31–34]. También hay péptidos exógenos como el LTNF (factor de neutralización de toxinas letales) que se aislaron del plasma sanguíneo de *Didelphis virginiana* y se descubrió que disminuyen la letalidad del veneno de las familias Crotalidae, Elapidae, Viperidae e Hydrophiidae [30].

Existen también enfoques de antivenenos de moléculas pequeñas. Por ejemplo, Varespladib es un inhibidor secretor de PLA₂ que se ha utilizado para tratar el síndrome coronario agudo [35]. Debido a que PLA₂ es una toxina clave en los venenos de muchas especies de serpientes [8], se han realizado investigaciones para indicar que varespladib puede disminuir la toxicidad de PLA₂. Varespladib y metilvarespladib accesible por vía oral evitaron la muerte de cerdos inyectados experimentalmente con

veneno de *M. fulvius*, según Lewin et al [36]. Varespladib pudo inhibir la actividad anticoagulante inducida por PLA2 de las cobras escupidoras africanas [37] e inhibió significativamente la toxicidad hemorrágica de *D. acutus* y *G. halys* [38]. Además, también existen inhibidores de moléculas pequeñas como batimastat para otras enzimas claves del veneno, como las metaloproteinasas [39,40].

1.1.4 Terapia antiofídica herbal

Los tratamientos tradicionales producidos a partir de plantas también podrían ser un enfoque viable en la lucha contra el envenenamiento [41]. En ese contexto, distintas especies han sido utilizadas por comunidades indígenas y afrodescendientes de Latinoamérica por sus efectos terapéuticos, entre ellos la actividad neutralizante del veneno de serpientes [3,42,43]. Entre estas se destacan plantas como *Brownea rosademonte* (Caesalpiniaceae), *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae), *Pleopeltis percussa* (Polypodiaceae), *Trichomanes elegans* (Hymenophyllaceae) y *Senna dariensis* (Caesalpiniaceae) [43] que han tenido respaldo científico.

Varias medicinas naturales activas derivadas de especies de plantas como *Aristolochia indica* [44] y el extracto de *Azadirachta indica* [45] han sido útiles para reducir la inflamación, el daño tisular local y las molestias agudas en el sitio de la mordedura. En la Amazonía, distintas plantas han sido descritos etnobotánicamente y estudiadas científicamente para determinar su actividad antiveneno, sobretodo especies de las Araceae como *Philodendron megalophyllum* con una inhibición de la actividad hemorrágica y fibrinolítica de 86,1% y 96,5% respectivamente [46], y plantas del género *Dracontium* como *D. dubium* [47], *D. loretense* [48], *D. croatii* [49,50], *D. spruceanum* [42]. El estudio con *D. dubium* se llevó a cabo en Colombia frente a la actividad letal, inflamatoria, coagulante y hemolítica del veneno de *B. asper* y se demostró que extractos acuosos de 500 y 1000 µg/g son suficientes para la supervivencia de los modelos animales a los ensayos usando la dosis letal del veneno en ratones y disminuir sus efectos miotóxicos e inflamatorios con una notable recuperación de daños macroscópicos e histológicos [47]. *D. loretense* en Perú demostró una dosis efectiva media de 31,15 µg/ratón ante la exposición de dos veces la dosis letal media (57,87 µg/ratón) en ratones demostrando la efectividad del extracto. En este estudio no sobrevivió ningún ratón que recibió el veneno sin *D. loretense*, y no falleció ninguno al que se le dio solo el extracto acuoso. Así mismo, en estudios que involucraron distintos extractos de plantas *D. croatii* y *D. spruceanum* mostraron actividad neutralizante *in vivo*

mediante pre-incubación permitiendo una tasa de supervivencia de hasta el 65% después de 6 horas haber de inyectado 99.3 µg de veneno *B. atrox* con respecto a la supervivencia del 10% de los que recibieron solo el veneno [42,49].

El uso de plantas como antivenenos no sólo está limitado a Latinoamérica, de hecho, hay estudios de impacto en África [51–53] y en Asia [44,54,55], demostrando así el gran valor que la terapia herbal tiene principalmente para zonas rurales.

1.1.5 *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott

La especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott perteneciente a la familia Araceae, es una planta emergente de aguas poco profundas (pantanos, estanques y orillas de arroyos) y es la especie de mayor distribución del género, encontrándose en Guyana, Venezuela, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Paraguay [27]. Es una planta perenne, con un rizoma tuberoso y esponjoso ubicado de manera horizontal al tallo. Las hojas se encuentran posicionadas en roseta apical, con un peciolo alargado, lámina foliar grande sin espinas ni fenestraciones. Las hojas son sagitadas con nervadura palmeada y margen entero. La inflorescencia consiste en un espádice encerrado en una espata torcida sobre un pedúnculo alargado. Sus flores son bisexuales. Su fruto es carnoso y produce bayas rojas, y se dispersa por semillas [57].



Figura 2-12. Tubérculo colectado de *U. sagittifolia* en la localidad de Puerto Misahualí, Napo, Ecuador. Los tubérculos de algunas Araceae, como la especie estudiada, están relacionados con actividad antiveneno.

Estudios etnofarmacológicos han reportado el potencial antiveneno del tubérculo de la planta, en países como Guayana Francesa, Colombia y Ecuador [49,58]. El tubérculo (Figura 2-12) se puede macerar, hervir o moler y aplicar directamente en la zona de la mordedura [58]. A pesar de que ha sido descrito etnofarmacológicamente, no existen estudios científicos sobre las propiedades químicas y farmacológicas de la planta, y la información sobre la misma es muy limitada.

1.1.6 Fitoquímica de *U. sagittifolia* (Rudge) Schott

Según datos recientes obtenidos de Moreno [59], el tamizaje fitoquímico de *U. sagittifolia* evidencia que el extracto etanólico es rico en metabolitos antiveneno, los cuales pueden ser los responsables de la inhibición enzimática y de sus actividades *in vivo* (Véase Tabla 1-1). Existen estudios han demostrado las propiedades antiinflamatorias de los compuestos fenólicos y los efectos antihemorrágicos de los flavonoides [46,60,61]. Algunos de ellos están relacionados con la quelación de átomos metálicos como Ca⁺ y Zn⁺, que son cofactores esenciales para la actividad enzimática [62]. *Schizolobium parahyba*, una planta rica en flavonoides como isoquercitrina, catequina y alocatequina, ha mostrado una gran actividad antihemorrágica contra las actividades tóxicas de los venenos de *B. jararacuçu* y *B. neuwiedi* [63].

Tabla 1-1. Fitoquímicos presentes en el extracto etanólicos de los tubérculos de *U. sagittifolia*.
(-) Ausencia, (+) Leve (++) Media (+++) Abundante.

Fitoquímicos	Abundancia
Alcaloides	+++
Saponinas	++
Terpenoides	+
Taninos	++
Quinonas	-
Cumarinas	+++
Compuestos fenólicos	+++
Flavonoides	+++
Antocianinas	-

Tomado de Moreno [59]

Los extractos de *Mangifera indica*, ricos en compuestos fenólicos como el pentagaloilo y la glucopiranos, tienen una reducción significativa en el edema y la hemorragia en la experimentación con animales en comparación con el control [64]. Los extractos de plantas con un gran número de alcaloides, especialmente el ácido aristolóquico, la ajmalina y la reserpina, han mostrado actividad contra el envenenamiento [65]. Se informó que las cumarinas como la herniarina y la ayapina, aisladas de *Eupatorium triplinerve*, tienen remedios contra la mordedura de serpiente [66]. Estos estudios muestran que los principales constituyentes del extracto etanólico de los tubérculos de *U. sagittifolia* están presentes en plantas con actividad antiofídica, pero su actividad *in vitro* e *in vivo* no ha sido estudiada.

1.2 Planteamiento del problema

En el mundo, anualmente, cinco millones de personas son mordidas por serpientes [67]. Estas mordeduras representan un problema de salud pública en países tropicales y subtropicales [68]. A pesar de que la letalidad no es tan alta comparada con otras enfermedades, el envenenamiento afecta a grupos vulnerables como mujeres, niños y agricultores en comunidades rurales pobres en países de ingresos bajos y medianos [69], con efectos a largo plazo como pérdidas de extremidades, daño renal, úlceras crónicas en la piel, parálisis neuromuscular, daños neurológicos derivados de la pérdida de sangre y hasta hipopituitarismo [70]. Esto impacta directamente a la calidad de vida de las personas en todas sus áreas: física, económica y social [71].

En Ecuador, los accidente ofídicos se dan mayormente en la región litoral y amazónica [72] y se han reportado tasas de morbilidad por mordeduras de serpientes de 1438 casos en el año 2020 con predominio de la patología en las provincias de Morona Santiago (58 casos), Manabí (53 casos), Esmeraldas (32 casos), los Ríos (26 casos), Orellana (21 casos) y Pastaza (20 casos) [73]. Existen 340 casos hasta la semana epidemiológica 15 del 2021, causando el fallecimiento de 6 personas [73]. En este contexto, la serpiente con más prevalencia de mordeduras en la Amazonía ecuatoriana es la *B. atrox* [72].

Estos mordeduras requieren tratamiento específico para evitar desenlaces como necrosis, sepsis y muerte [74]. El tratamiento de primera línea en el Ecuador para los accidentes Bothrópicos es el uso antiveneno heterólogo siendo el SAO-B polivalente de

fabricación costarricense el producto de referencia nacional, que puede usarse para neutralizar el veneno de *B. asper* y *B. atrox*; aunque en su pool inmunogénico se utilizan solo *B. asper*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus cumanensis* de ese país [72]. Al momento no se dispone de antiveneno de elaboración con los venenos de *B. atrox* presentes en Ecuador; de esta manera el antiveneno podría no tener la efectividad terapéutica esperada y podría aumentar la frecuencia y gravedad de reacciones adversas por las reacciones cruzadas debido a su inespecificidad por la variación interespecífica e intraespecífica del veneno [9]. Además, la mayor parte de las mordeduras de serpientes del país se dan en zonas rurales [73] y dado que el antiveneno de proteína heterólogas solo puede ser administrado en centros de salud bajo la supervisión de profesionales de la salud [74], existen grandes limitaciones en su uso. No existe, por lo tanto, un tratamiento alternativo o terapias conjuntas validadas científicamente para neutralizar los efectos locales, retrasar los efectos sistémicos y disminuir la morbilidad asociada a las mordeduras de *B. atrox* en Ecuador.

1.3 Justificación de la investigación

Debido a las limitaciones y riesgos del uso de los antivenenos tradicionales en las zonas rurales del país, nace la necesidad de desarrollar una alternativa a la terapia tradicional, que sea segura de administrar, que proporcione efectos terapéuticos similares y tenga un amplio espectro de inhibición, sobre todo para los efectos locales y al inicio del envenenamiento para evitar complicaciones que pueden generar mortalidad y morbilidad.

El uso de plantas medicinales por comunidades indígenas ha sido descrito para el tratamiento de estas mordeduras, incluyendo venenos y toxinas del género *Bothrops spp.*, [43,50,75,76]. Algunas especies de Araceae como *Dracontium spp.* han demostrado tener efecto neutralizante frente a este veneno bothrópico con validación científica [47,48,77]. Sin embargo, no existe ningún estudio que valide el efecto terapéutico de otros tubérculos de Araceae que han sido descritos etnobotánicamente como los de *U. sagittifolia* [58] y que podrían complementar la terapia con antivenenos tradicionales o mostrar una mayor neutralización que otras especies ya descritas.

La terapia herbal, a diferencia de los antivenenos por proteínas heterólogas, produce una inhibición enzimática no ligada a anticuerpos, lo que podría darle flexibilidad para tratar las distintas variaciones de las enzimas presentes en el veneno, e incluso, tratar

toxinas de géneros y especies diferentes. Por ejemplo, los ácidos aristolóquicos, que se encuentran en especies de *Aristolochia* de la India reportan actividad inhibitoria *in vitro* contra L-aminoácido oxidasas [78] y también inhiben las PLA₂ y otras enzimas relacionadas al edema del veneno de *D. russelii* [79]. Además, la preincubación de este compuesto con el veneno de *B. pirajai*, una especie con características toxicológicas completamente diferentes a *D. russelii*, redujo los efectos miotóxicos de la piratoxina-I en más del 80% [80].

Validar el conocimiento etnobotánico es importante para encontrar nuevas moléculas activas. Actualmente, alrededor del 60% de los compuestos medicinales se derivan o se inspiran en productos naturales o utilizan su farmacóforo como modelo [81,82]. Así, los inhibidores herbales capaces de mejorar el cuadro de envenenamiento producido por un veneno de serpiente pueden ser futuros fármacos aprobados para su uso en humanos [49]. Por eso, es necesario estudiar la efectividad del extracto de *U. sagittifolia* frente a las actividades tóxicas del veneno de *B. atrox* para buscar alternativas terapéuticas a un problema de salud pública en la Amazonía ecuatoriana y en las zonas rurales del mundo.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 General

- Estudiar *in vivo* el efecto del extracto etanólico del tubérculo de *U. sagittifolia* frente a los efectos locales producidos por el veneno de *B. atrox*. y su capacidad de inhibir toxinas enzimáticas *in vitro*.

1.4.2 Específicos

- Caracterizar los efectos tóxicos, tales como la letalidad, edema y hemorragia inducidos por el veneno y el potencial de neutralización del extracto.
- Medir la capacidad inhibitoria del extracto etanólico frente a las enzimas del veneno mediante ensayos enzima-sustrato.
- Realizar electroforesis del veneno crudo pre-incubado con el antiveneno para elucidar el inmunorreconocimiento.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Venenos de *Bothrops atrox*

En la presente investigación, venenos de cinco individuos de *B. atrox* de tres regiones de la Amazonía ecuatoriana fueron obtenidos para la generación del pool de veneno de referencia. Fueron empleados venenos colectados y evaluados en el estudio de Patiño et al [10]. Las serpientes fueron inducidas a morder en un vaso de precipitado de vidrio cubierto con Parafilm®. La secreción se pipeteó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, en un recipiente al vacío que contenía sulfato de calcio anhidro, para almacenar los venenos como muestras secas. Hasta su uso, esta mezcla de veneno fue mantenido bajo refrigeración a -4 °C. Este procedimiento fue realizado en colaboración con la Universidad Indoamérica, y con permiso de investigación aprobado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador: MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115.

2.2 Material vegetal y preparación de extractos

La colecta del material vegetal se realizó con el debido permiso del Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, número MAATE-DBI-CM-2021-0180. Los ejemplares de *U. sagittifolia* (Rudge) Schott fueron colectados en la localidad de Puerto Misahuallí, Napo, Ecuador (1°03'21.0"S 77°40'00.5"W) como se ilustra en la Figura 3-12. El herbario se preparó siguiendo el protocolo de plantas vasculares, con la recolección de ejemplares con flores (Figura 4-12). Se lavó el material vegetal con agua corriente, y se tomaron partes representativas de la planta como el tallo, hojas y flores para ser prensado y secado a temperatura media de 40 °C durante una semana. El ejemplar fue enviado al Herbario Nacional del Ecuador (QCNE) con número de depósito QCNE-030-2021. El proceso de identificación taxonómica fue llevado a cabo por el investigador Thomas Croat del Missouri Botanical Garden.

Los tubérculos de los ejemplares restantes fueron lavados y triturados en agua destilada. El producto obtenido fue posteriormente filtrado y sometido al proceso de liofilización (Benchtop Pro 9 L, Omnitronics) durante tres días. El polvo obtenido fue conservado a -4 °C. El extracto etanólico fue preparado mediante maceración del polvo en etanol absoluto durante tres días. En la siguiente etapa, los residuos sólidos fueron removidos por filtración y el solvente fue evaporado a presión baja (100 mbar) y

temperatura media (45 °C) en rotavapor Buchi (Rotavapor® R-300). Finalmente, el extracto fue conservado a -4 °C.

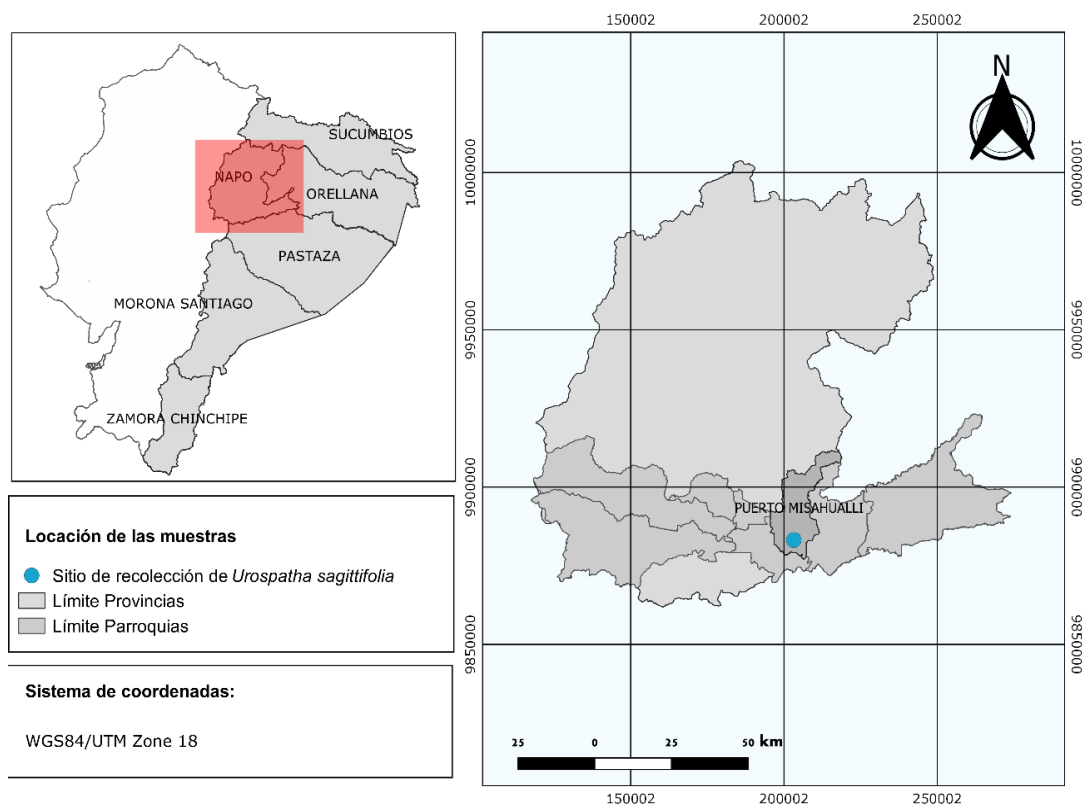


Figura 3-12. Mapa del sitio de recolección y muestreo de los ejemplares de *U. sagittifolia*. Las muestras fueron colectadas en la localidad de Puerto Misahuallí, Napo, Ecuador (1°03'21.0"S 77°40'00.5"W).

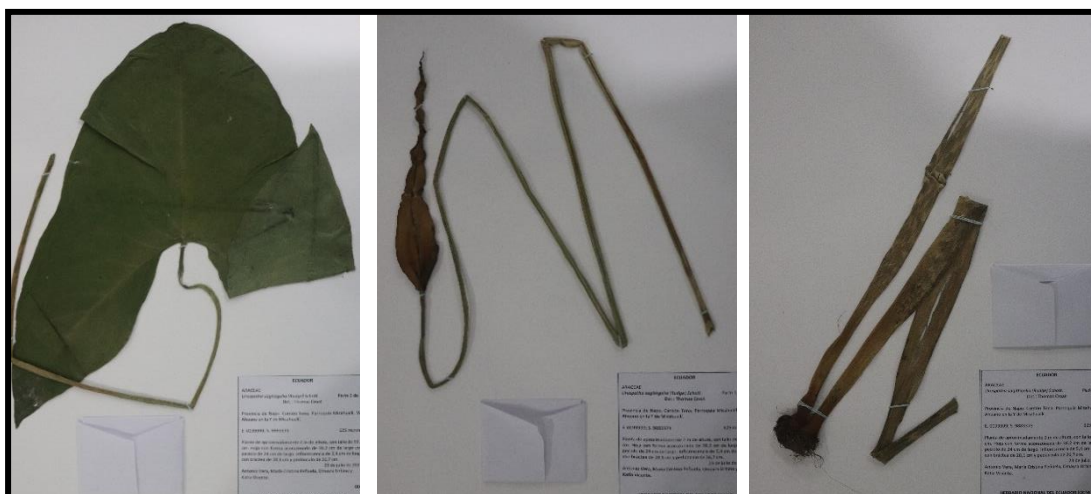


Figura 4-12. Herbario de *U. sagittifolia*. Se usó el protocolo de secado a temperatura media para plantas vasculares en las partes más representativas de la planta para su depósito e identificación.

El extracto seco fue diluido en una solución con proporción 1:3 (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) y solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) (Vehículo) antes de los ensayos biológicos. Los tratamientos con el extracto etanólico de la planta (USet) fueron

preparados de manera 1:12,5 (m/m), 1:25 (m/m), 1:50 (m/m) y 1:81 (m/m) de veneno con respecto al extracto etanólico seco.

2.3 Modelos animales

Ratones CD1 machos de pesos de entre 20 y 22 g fueron donados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez de Guayaquil, Ecuador. Los ratones fueron mantenidos a 25 °C y con intervalos de luz y oscuridad de 12 horas en jaulas debidamente adaptadas. Se mantuvo una alimentación estándar dos veces al día con alimento para roedores y agua ad libitum. El uso de modelos animales tiene autorización por parte de la Coordinación de Investigación de la Universidad Regional Amazónica Ikiam siguiendo las recomendaciones del manual de la Unión Europea sobre experimentación con animales (Directiva del Consejo Europeo 2010/63/UE).

2.4 Perfil bioquímico del veneno

Para evaluar el perfil de las toxinas del pool se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), según la metodología de Patiño et al. [10]

Para la obtención del perfil cromatográfico por RP-HPLC, se realizó una disolución homogenizando durante 1 minuto, 80 µl de bicarbonato de amonio (1 M), 120 µl de ácido trifluoroacético (0,1 %) y 1 mg del pool en un agitador vórtex. Luego, 100 µl de esta disolución fue inyectada en el HPLC (PREP 150 LC, Waters) equipado un detector UV/Vis 2489. La corrida se realizó en una columna C18 (250 × 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm) con una elución de 1 ml/min empleando gradiente lineal de ácido trifluoroacético al 0,1 % (fase móvil A) y; acetonitrilo y ácido trifluoroacético al 0,1 % en una proporción de 66:34 (fase móvil B). El detector fue colocado a 214 nm. Durante la corrida, se recolectaron las fracciones en tubos eppendorf, para la posterior evaporación de sus disolventes durante 5 horas en el concentrador al vacío Genevac miVac. Las muestras resultantes se conservaron a -4 °C.

Para la separación por electroforesis de las fracciones, el contenido de cada eppendorf fue disuelto y homogenizado en 1 ml de tampón de carga (Tris-HCl 0,075 M, pH 6,8; 10 % (v:v) de glicerol, 4 % (m:v) de SDS, 0,001 % (m:v) azul de bromofenol). Se inyectaron

20 µl de cada fracción en el gel. Los geles de apilamiento y corrida tuvieron una concentración de 5 % y 12,5 % de poliacrilamida respectivamente, en presencia de ditioneitol (DTT) 1 M. La corrida se llevó a cabo a 25 °C con un voltaje de 120 mA. Marcadores moleculares Rainbow™ fueron usados y los geles fueron teñidos con azul brillante Coomassie.

2.5 Ensayos de inhibición enzimática

La inhibición enzimática del pool de venenos se evaluó mediante espectrofotometría en un lector de placas (Glomax Discover System, Promega). Las principales proteínas catalíticamente activas del veneno fueron evaluadas. Los resultados se expresarán como la tasa de actividad enzimática con los tratamientos USet con respecto a la actividad enzimática del veneno sin extractos, que representa el 100%. Se realizaron tres experimentos independientes para cada ensayo siguiendo la metodología de Patiño et al. [10]. La absorbancia de las diferentes proporciones de extracto y de su degradación natural fueron tomados en cuenta en el ajuste de los valores y cálculo del porcentaje de inhibición de las actividades.

2.5.1 Fosfolipasas A₂

La actividad PLA₂ del pool se determinó con el sustrato NOBA o 4-nitro-3 (octanoiloxi) ácido benzoico. Se preparó el sustrato disolviendo 3,1 mg de NOBA en 10 ml de tampón B (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 M, NaCl 10 mM, pH 7,8) y 1 ml de acetonitrilo. El pool fue disuelto en tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) con concentración de 1 mg/ml. Luego, en una microplaca de 96 pocillos, se combinaron 220 µl de sustrato, 20 µl de veneno y 20 µl de los distintos tratamientos. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos y se configuró el lector de placas a 405 nm. La absorbancia fue tomada 3 veces en intervalos de 10 minutos. La actividad enzimática fue determinada por las diferencias en los valores de absorbancia con respecto al tiempo. La absorbancia se tomó inmediatamente después de la incubación y 10 minutos después.

2.5.2 Serin proteinasas

El sustrato L-BapNa (Sigma-Aldrich) o N-α-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida se preparó en disolviendo 10,9 mg en 25 ml en tampón B y 250 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). El pool se disolvió en el tampón A una concentración de 1 mg/ml. Luego, se

homogenizaron 20 µl de veneno con 200 µl de la solución del sustrato para posteriormente añadir 25 µl de tampón A con 25 µl de tratamientos USet en una microplaca de 96 pocillos. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se midieron las absorbancias a 405 nm justo posterior a la incubación y 10 minutos después.

2.5.3 Metaloproteinasas o actividad caseinolítica

Inicialmente se preparó una solución de sustrato con 40 mg de azocaseína diluida en 8 ml de tampón A. El pool se disolvió en el tampón A en una concentración de 1 mg/ml. Se mezclaron 10 µl de veneno con 20 µl de tratamientos USet y 90 µl de solución de sustrato. Esta mezcla fue incubada durante 90 minutos a 37 °C. Luego, se adicionó 200µl de ácido trifluoroacético al 5 % a todas las muestras y se centrifugó durante 5 minutos a 8000 rpm. 150 µl del sobrenadante fueron tomados y se los colocó en una microplaca de 96 pocillos en combinación con 150 µl de NaOH 0,5 M. El lector de placas se fijó a 450 nm. La actividad enzimática fue determinada mediante la comparación de los valores de absorbancia corregidos.

2.6 Ensayos de actividad biológica

2.6.1 Edema

Se formaron grupos de 4 ratones para cada tratamiento USet. A cada uno se les indujo inflamación mediante inyección subcutánea en la superficie plantar de la pata trasera izquierda con dosis de 10 µg de veneno. Luego se inyectó en la superficie plantar de la pata trasera derecha el veneno con los tratamientos USet previamente incubados por 30 minutos a 37°C. Todas las muestras tenían un volumen final de 50 µl. El diámetro de la pata fue medido antes de la inyección del veneno y 30 minutos después, utilizando un pie de rey. El edema se expresó como el aumento en el diámetro de la pata (mm) después de la inyección de veneno en relación con el diámetro previo a la inyección.

2.6.2 Hemorragia

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos (n = 4). Los animales recibieron una inyección subcutánea dorsal de 15 µg de veneno con los diferentes tratamientos USet y sus respectivos controles. Después de 3 horas, los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical para diseccionar la piel dorsal con el fin de medir el área

de hemorragia (cm²). Se tomaron fotografías de los halos hemorrágicos que luego fueron procesadas con ImageJ.

2.6.3 Letalidad

Los ratones fueron aleatoriamente separados en grupos (n = 4). Se les inyectó intraperitonealmente soluciones preincubadas (30 minutos a 37 °C) de 200 µl que contenían diferentes tratamientos USet con una dosis desafío de veneno de 180 µg para ejemplares ecuatorianos, tomada de Patiño et al. [10]. La letalidad del extracto solo a dosis altas (1000 µg/g de ratón) también fue evaluada. Los cambios de comportamentales y la mortalidad se registraron durante 48 horas. La curva de supervivencia se realizó mediante el estimador de límite de producto de Kaplan-Meier.

2.7 Electroforesis con venenos incubados

Para determinar si las diferentes proporciones del extracto degradan, forman complejos proteicos o precipitan las proteínas del pool de venenos, se realizó una SDS-PAGE con las mismas condiciones descritas en la metodología del gel para la caracterización bioquímica del veneno (Sección 2.4). Para este análisis, se utilizaron 10 µl de veneno y 10 µl de tratamientos USet en diferentes razones.

2.8 Análisis estadísticos y gráficas

Las pruebas z y t para dos muestras independientes fue el análisis estadístico de elección para confirmar si había diferencias significativas entre los grupos ensayados. El nivel de significancia se estableció con $p \leq 0.05$. El análisis de datos y las gráficas se realizaron en OriginLab.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Perfil bioquímico del pool de venenos

La separación cromatográfica de las toxinas por RP-HPLC evidenció la presencia de 26 fracciones. El análisis de la masa molecular de estas fracciones por SDS-PAGE señala que el veneno tiene bandas evidentes en los rangos de masa de proteínas como PLA₂, lectinas tipo C, PI-SVMP, SVSP, PIII-SVMP y L-amino oxidasas previamente caracterizadas estructuralmente en este veneno [10]. De manera general, las principales bandas observadas en el gel se encuentran distribuidas en los siguientes rangos: 20-35 kDa (9,12,13,14,23,24,26), 35-40 kDa (14, 23,24), 45-55 kDa (19,20,21,22,23,25,26). Los picos con mayor absorbancia: 4, 10, 15, 23, 24, 25 corresponden a los tiempos de retención 21, 43, 64, 84, 87 y 89 min (Figura 5-12). Estos hallazgos sugieren la riqueza de PIII-SVMP y PI-SVMP en el veneno de *B. atrox* ecuatoriano, lo que lo hace altamente hemorrágico.

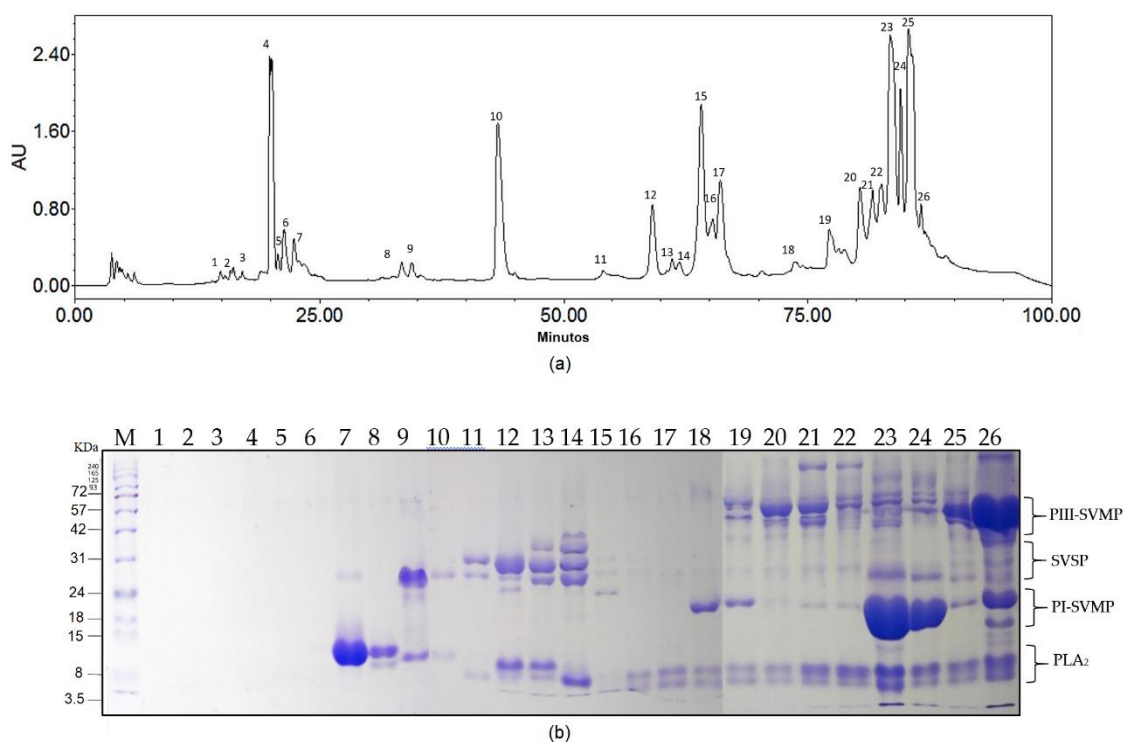


Figura 5-12. Perfil bioquímico del pool de *B. atrox*. (a) Cromatograma del veneno a 214 nm (b) Geles SDS-PAGE muestran las proteínas contenidas en las fracciones del pool. Los marcadores moleculares (M) (kDa) se muestran en el lado izquierdo del gel.

3.2 Ensayos de inhibición enzimática

3.2.1 Inhibición de fosfolipasas A₂

Los venenos bothrópicos tienen la capacidad de generar inflamación, miotoxicidad y necrosis debido a las acciones enzimáticas de las PLA₂, en conjunto con péptidos proinflamatorios y las K49-PLA₂ [83,84]. Se ha demostrado en resultados anteriores que el pool de venenos estudiado posee PLA₂, en casi todas las fracciones estudiadas, lo que la convierte en un blanco terapéutico potencial. La actividad fosfolipásica del pool estudiado, demuestra la presencia de PLA₂ catalíticamente activas, que son inhibidas por los componentes del extracto. Se demostró que todos los tratamientos USet generan una disminución significativa de la actividad fosfolipásica del veneno (Figura 6-12), con porcentajes de inhibición, de menor a mayor proporción, 29,78%, 60,19%, 75,86% y 81,19%. Como se puede inferir, la actividad PLA₂ es inversamente proporcional a la cantidad de extracto usado.

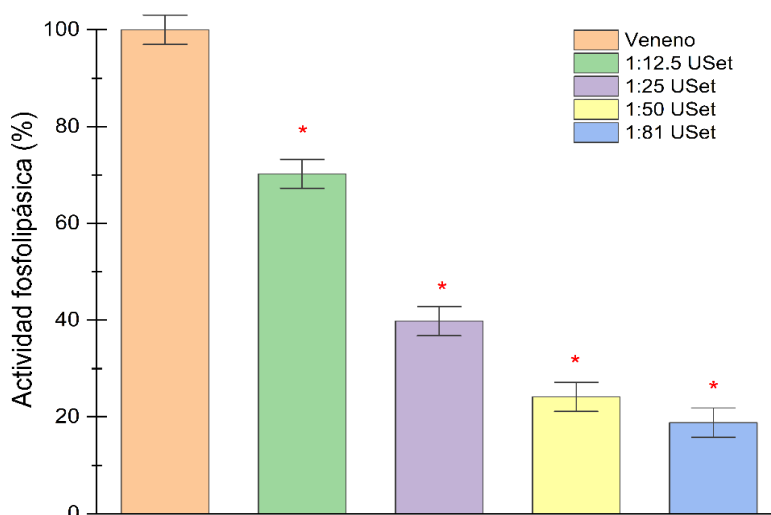


Figura 6-12. Actividad fosfolipásica del pool de venenos de *B. atrox* comparada con la de los tratamientos USet. Inhibiciones enzimáticas importantes dependientes de la dosis produjo el extracto en las actividades PLA₂ catalíticas del pool. * = Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al veneno crudo.

3.2.2 Inhibición de serin proteinasas

La serin proteinasas son enzimas importantes de las serpientes de género *Bothrops* encargadas de efectos tóxicos del veneno como la coagulopatía. El pool de venenos demostró tener actividad enzimática correspondiente a esta familia de proteínas, la misma que fue inhibida de manera dosis dependiente por los tratamientos USet (Figura 7-12). La reducción de la actividad, de menor a mayor proporción de veneno:extracto son: 27.15%, 28.14%, 48.10% y 46.11% con respecto al veneno crudo.

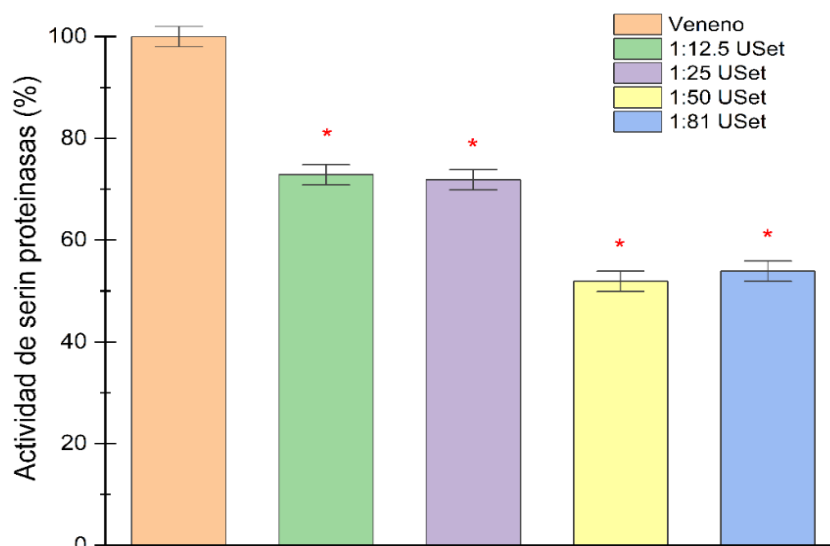


Figura 7-12. Actividad de serin proteinasas del pool de venenos crudo de *B. atrox* y de los tratamientos derivados del extracto etanólico de *U. sagittifolia*. Se observa inhibiciones enzimáticas para todos los tratamientos USet, con reducciones importantes en la actividad serin proteásica. * = Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al veneno crudo.

3.2.3 Inhibición de metaloproteinasas

El pool de veneno estudiado tiene una gran cantidad de metaloproteinasas, como se muestra en la sección 3.1, lo que lo hace altamente hemorrágico. La actividad metaloproteínásica y caseinolítica se redujo considerablemente para las cuatro proporciones de USet (Figura 8-12) con disminuciones de: 1:12.5 con 12.8%, 1:25 con 18.72%, 1:50 con 17.90%, 1:81 con 19.87%. Mayores dosis no ofrecen mejores resultados de inhibición en este ensayo.

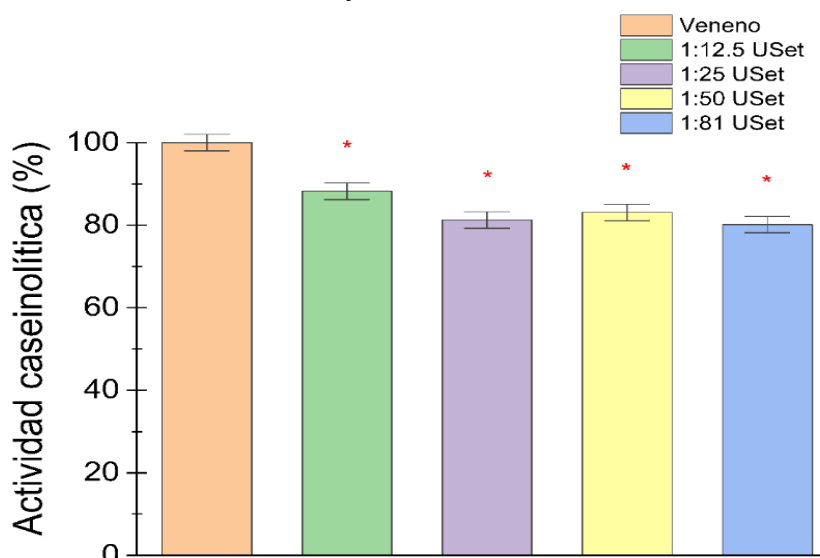


Figura 8-12. Actividad del pool de venenos de *B. atrox* y los tratamientos USet a diferentes razones veneno:extracto para la degradación de azocaseína. El extracto redujo significativamente la actividad caseinolítica, aunque mayores dosis parecen no tener mejores resultados. * = Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al veneno crudo

3.3 Pruebas de inhibición *in vivo*

3.3.1 Actividad antiinflamatoria

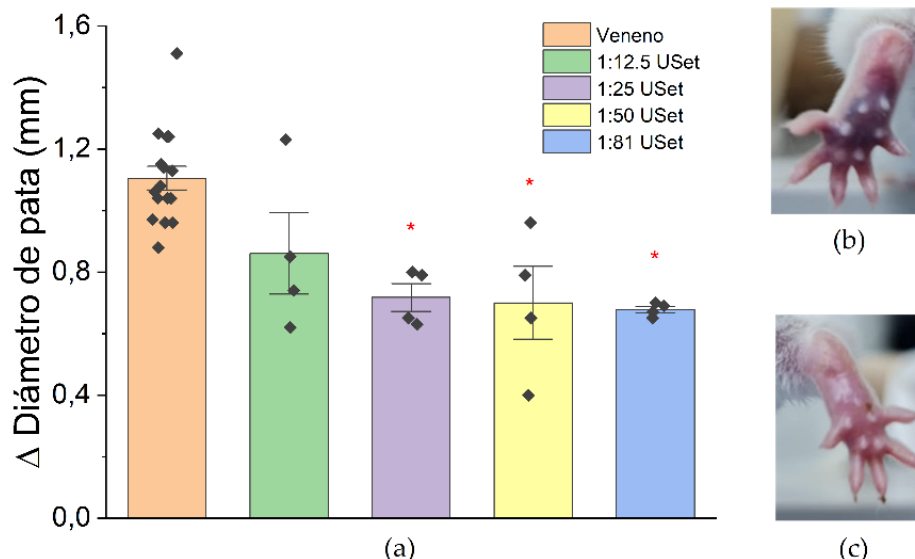


Figura 9-12. Acción inhibitoria de los tratamientos USet en el efecto edematogénico del veneno de *B. atrox*. (a) Diferencias entre los diámetros de las patas medidos antes y después de las inyecciones de los tratamientos (b) Pata solo con veneno (c) Pata con tratamiento 1:81 USet. * == Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en comparación con el veneno

El característico efecto edematogénico desencadenado por venenos bothrópicos, fue observado en las patas de los animales que recibieron 10 μ g de veneno *B. atrox*. Incremento del volumen de la pata y cambio coloración son notorios en el área de inyección de veneno. Se pudieron observar reducciones significativas en el diámetro de la pata con los tratamientos USet en las razones 1:25 / 1:50 / 1:81, (Figura 9-12a) con porcentajes de inhibición del 35.10%, 33.68% y 38.72% respectivamente. Además, se visualizó un cambio del color en la superficie plantar de los ratones debido la reducción de la hemorragia producida por la inyección del veneno debido al tratamiento USet (Figura 9-12c) con respecto al veneno (Figura 9-12b).

3.3.2 Actividad antihemorrágica

La inyección subcutánea de 15 μ g de veneno causó un alto daño hemorrágico, caracterizado por halos de color rojo intenso y grandes áreas de afectación, característico de venenos ricos en metaloproteinasas, como el utilizado en el presente estudio. Se produjeron halos hemorrágicos de $2,82 \pm 0,72$ cm², $1,98 \pm 0,24$ cm², $1,95 \pm 0,21$ cm², $1,57 \pm 0,46$ cm², $1,62 \pm 0,57$ cm² para el veneno y los tratamientos USet con proporciones 1:12,5 / 25:1 / 50:1 / 81:1 respectivamente. Todos los tratamientos

provocaron una reducción significativa de la hemorragia en los modelos animales, que pudo ser evidenciada visualmente (Figura 10-12).

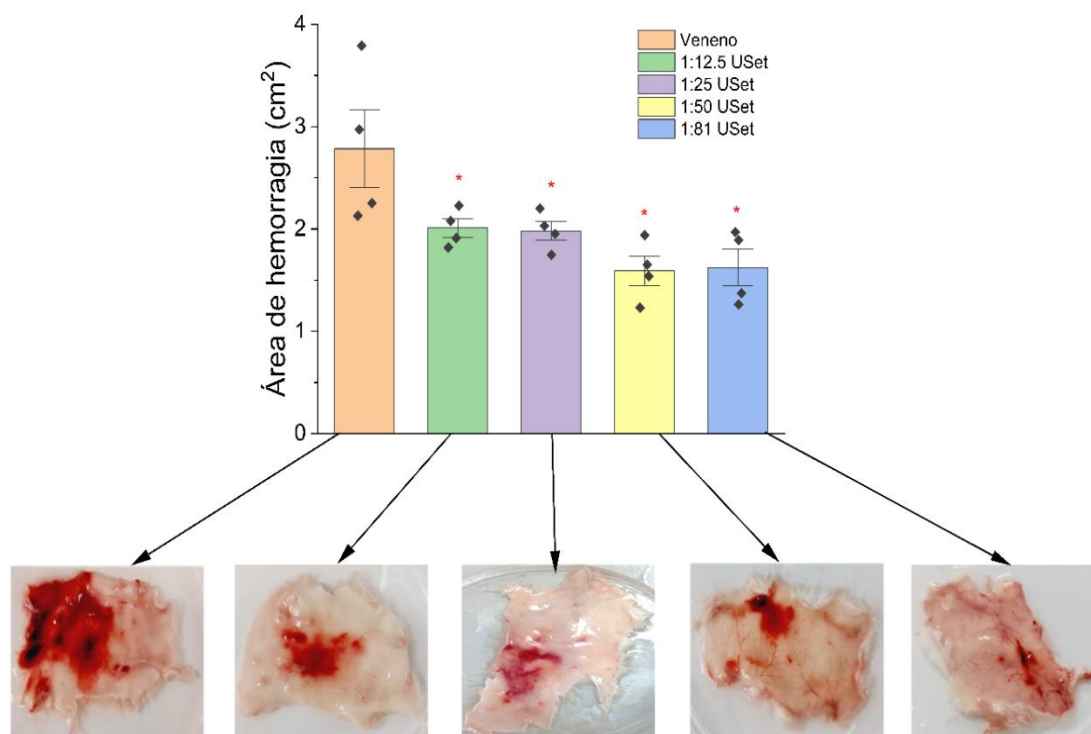


Figura 10-12. Áreas de los halos hemorrágicos producidos por el veneno y los tratamientos USet. Debajo de cada grupo, se encuentra una fotografía representativa del daño hemorrágico producido. * == Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en comparación con el veneno.

3.3.3 Aumento de la tasa de supervivencia (Letalidad)

La inyección de 180 µg de veneno indujo debilidad, respiración acelerada, aturdimiento, limitada capacidad de movimiento y muerte de los modelos animales de manera mimética al envenenamiento con síntomas característicos de una mordedura por *B. atrox*. El veneno de referencia (crudo) provocó la muerte de los animales en un periodo de 2h. Diferentemente, cuando el veneno fue pre-incubado con el extracto etanólico, la tasa de supervivencia fue alterada significativamente en todas proporciones evaluadas (Figura 11-12). Específicamente, 1:12,5 redujo la mortalidad en un 25%, 1:25 y 1:50 lograron aumentar la tasa de supervivencia al 50% y 1:81 produjo los mejores resultados permitiendo reducir la letalidad del veneno en un 75%. En las tasas evaluadas la supervivencia no alcanzó 100%. Colectivamente, estos datos destacan la habilidad de *U. sagittifolia* en favorecer la supervivencia de los animales sometidos al ensayo de envenenamiento.

El extracto no presentó toxicidad mismo cuando evaluado en altas dosis, evidenciando la seguridad del uso del mismo. Ninguna muerte fue observada en los animales que recibieron este tratamiento. Los animales presentaron capacidades motoras normales durante todo el periodo del ensayo. Un leve discomfort y letargia fue observada en el periodo inicial post-inyección, pero con una rápida recuperación del taxismo.

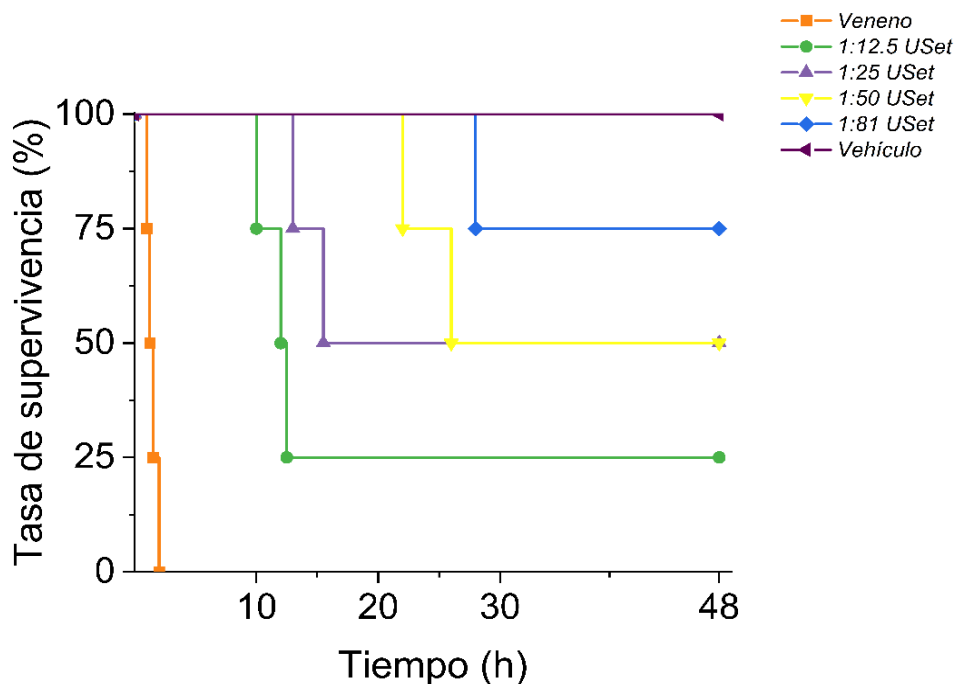


Figura 11-12. Porcentaje de supervivencia de los modelos animales sometidos a una dosis letal de veneno de *B. atrox* (crudo) y con los tratamientos USet. El extracto aumentó considerablemente el tiempo de muerte y aumentó la tasa de supervivencia con respecto al veneno crudo en todos los grupos estudiados.

3.4 Caracterización electroforética de venenos incubados con USet

El análisis electroforético del pool crudo (V), corrobora la presencia de las proteínas encontradas en las fracciones del veneno (Sección 3.1). En este gel, hay bandas en los rangos de masa de 12 a 14 kDa (PLA₂ y CTL), 21 a 25 kDa (PI-SVMP), 40 a 46 kDa (SVSP) y 50 –58 kDa (PIII-SVMP y LAO) (Figura 12-12). También existen proteínas del extracto etanólico (PE) con una masa de 21-23 kDa, que están presentes en todos los tratamientos USet y que aumentan proporcionalmente con la dosis. Las proteínas pertenecientes a las familias PLA₂, CTL, PI-SVMP, PIII-SVMP y LAO se conservan durante todos los tratamientos, lo que significa que la disminución de sus efectos tóxicos y enzimáticos es debido a inhibición catalítica por los componentes de extracto. Sin embargo, la banda perteneciente a SVSP, parece desvanecerse a media que la proporción veneno:extracto es mayor. Interesantemente, una banda de una/s proteína/s desconocidas de 35 kDa, que no está presente en el veneno crudo (V) o en el extracto

sin veneno (USet), aumenta su pigmentación a medida que las SVSP desaparecen. Esto, puede indicar la precipitación de las SVSP con dosis altas de USet, pero también puede indicar degradación de las proteínas del veneno. Existe, además, una banda que aumenta de pigmentación dependiente de la dosis USet y que no se encuentra en el veneno o en el extracto crudo. Tiene mayor peso molecular que las SVSP (72 kDa), lo que indica la formación de complejos moleculares.

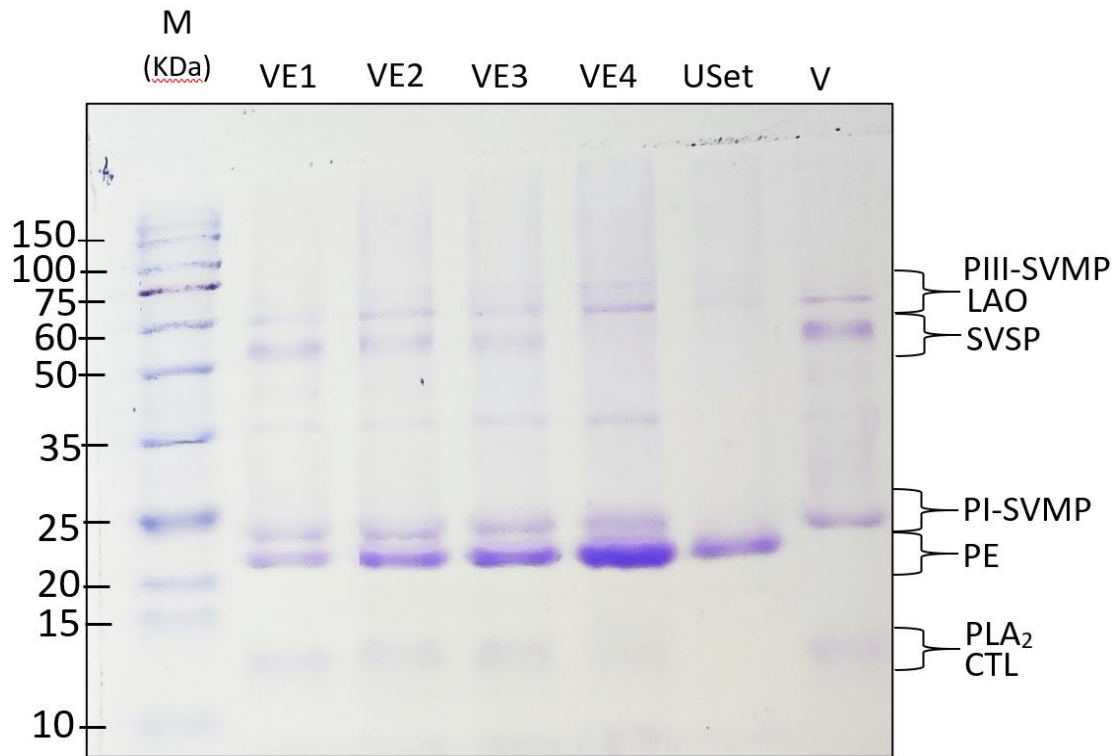


Figura 12-12. Gel SDS-PAGE muestra las bandas de las proteínas contenidas en el pool crudo de *B. atrox* (V) y los venenos incubados con extracto. El inmunorreconocimiento de los componentes del extracto y el veneno fue visualizado, aunque el mecanismo exacto necesita estudios complementarios. M= Marcador molecular; V1= 1:12,5; V2= 1:25; V3= 1:50; V4= 1:81; USet= Solo extracto etanólico.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Los antivenenos tradicionales de proteínas heterólogas son sueros altamente inmunes tomados de animales como caballos u ovejas, que se adhieren a los componentes inmunogénicos del veneno y los vuelven inactivos [85]. La producción de antiveneno animal requiere mucho tiempo, es costosa y requiere condiciones de almacenamiento perfectas [86]. Las alternativas a estos antivenenos tradicionales se pueden encontrar en el reino vegetal. Los curanderos tradicionales utilizan la medicina herbaria para tratar los envenenamientos de serpientes en todo el mundo; sin embargo, la medicina moderna no acepta la práctica por falta de estudios científicos [75]. Los extractos de plantas se han utilizado durante mucho tiempo particularmente en lugares tropicales donde hay muchos suministros herbales [49]. La seguridad, la eficacia, las preferencias culturales, el bajo costo y la dependencia de los bosques cercanos contribuyen al uso de plantas medicinales para las mordeduras de serpiente, sobretodo en zonas rurales [75].

El veneno de serpiente es una mezcla compleja de proteínas (enzimáticas y no enzimáticas) y otros componentes menores como iones inorgánicos, carbohidratos, lípidos, aminos y nucleótidos [85–87]. Los efectos tóxicos del veneno se deben a una combinación sinérgica de componentes enzimáticos y no enzimáticos [88]. La caracterización bioquímica, es importante para identificar estos componentes que sirven como base teórica para los ensayos *in vivo* e *in vitro*. En ese contexto, según los resultados de Patiño et al. [10], que estudió y caracterizó las toxinas de ejemplares de *B. atrox* de la Amazonía ecuatoriana, en esta zona geográfica los venenos son altamente hemorrágicos con predominancia de las metaloproteinasas. Sin embargo, habían diferentes cantidades de PI-SVMP y SIII-SVMP, así como también pequeñas diferencias en el resto de las proteínas involucradas (PLA₂ y SVSP) [10]. Según el perfil bioquímico realizado, el pool estudiado es una muestra representativa de la variabilidad de los venenos de la zona, que incluye las características bioquímicas, tóxicas y enzimáticas anteriormente estudiadas.

Estas enzimas fueron inhibidas de manera dosis dependiente por los extractos USet, lo que demuestra que se podría obtener buenos resultados en los ensayos *in vivo*. Existen estudios donde ha habido inhibición de las PLA₂ por medio de extractos herbales. Un ejemplo es el caso de la planta *Azadirachta indica*, de la cual del extracto metanólico de

las hojas se aisló el compuesto "AIPLAI" que inhibió de manera dosis dependiente esta enzima, con rangos desde 10% hasta el 60% de reducción de actividad [45]. En otro estudio llevado a cabo por Cavalcante et al. [89] se descubrió que el extracto acuoso de *Casearia sylvestris* protegía los músculos de dos toxinas Lys49-PLA2 y prevenía la obstrucción neuromuscular causada por las PLA₂ catalíticamente activas. Así mismo, se ha demostrado inhibición por de dos SVSP derivadas del veneno de *Crotalus simus* por parte de flavonoides aislados de cítricos, especialmente la hesperetina [90]. También existen inhibidores de plantas para la SVMP. Los venenos de *B. neuwiedi* y *B. jararacussu* fueron suprimidos por saponinas triterpenoides derivadas de la planta *Pentaclethra macroloba*, específicamente macrolobina A y B, que disminuyeron la actividad hemorrágica. Además, las saponinas redujeron la actividad fibrinogenolítica causada por las enzimas metaloproteasas de forma dependiente de la dosis. En una proporción de 1:15, la macrolobina A inhibió la actividad proteolítica causada por las PI-SVMP y PIII-SVMP hasta en un 90 % y un 80 %, respectivamente [91]. Estas investigaciones apoyan nuestros resultados: Los extractos herbales pueden generar inhibición enzimática y, generalmente, son dosis-dependientes.

De manera general, los tratamientos USet contribuyen a la mitigación de los efectos locales y aumenta las tasas de supervivencia en los modelos animales estudiados. La actividad antiveneno sugiere ser, en la mayoría de los ensayos evaluados, dependiente de la concentración. El mismo patrón dependiente de la dosis se muestra en todos los ensayos biológicos y enzimáticos, con excepción en la actividad caseinolítica. Por lo tanto, las moléculas involucradas en la neutralización de los componentes del veneno son escasas y se necesitan dosis más altas de USet para mostrar mejores resultados. Caro et al [47] encontraron que los extractos etanólicos de *D. dubium* dependen de la dosis, las dosis más altas tienen mejores resultados. Curiosamente, Lovera et al. [48] encontraron que los extractos acuosos de bulbos de *D. lorentense* necesitan concentraciones menores para neutralizar el efecto letal del veneno de *B. asper*. Estos resultados parecen contradictorios, pero obtenemos patrones de inhibición similares a los de Caro et al. [47] y de otros estudios discutidos anteriormente.

A pesar de toda esta base química, los estudios de neutralización de toxinas deben ser verificados en modelos animales, mismo poseen una matriz biológica compleja, donde es posible determinar mejor la actividad antiveneno para los efectos locales y sistémicos. El edema es un efecto local de alta frecuencia en los envenenamientos provocados por serpientes *Bothrops spp.* La clínica de este efecto se caracteriza por

un el aumento de volumen, migración de células inmunitarias y el daño en el tejido afectado. Estos efectos fueron evidenciados en la pata de los ratones, con un aumento significativo en el diámetro de la pata y cambios notables de coloración. Sin embargo, se encontró una reducción significativa del edema inducido por el veneno en las patas tratadas con extractos de *U. sagittifolia*. Los tratamientos USet, con excepción de 1:12.5, fueron efectivos para reducir la inflamación. Los ensayos enzimáticos respaldan estos resultados *in vivo*. Hay una reducción significativa de la actividad de PLA₂, que es una enzima relacionada con la inflamación y la miotoxicidad. Resultados similares se obtuvieron en Caro et al., donde extractos etanólicos de *D. dubium* muestran un efecto inhibidor de edema incluso superior a un antiveneno de proteínas heterólogas [47]. En otros estudios, existe una reducción significativa del edema inducido por el veneno, dependiente de la dosis con diferentes plantas: *Piper longum* [92], *Cordia verbenacea* [93], *Loasa speciosa*[94], *Chaptalia nutans*[94] y *Uncaria tomentosa* [94].

La hemorragia es otro de los efectos locales comunes del envenenamiento por *Bothrops* y como se determinó anteriormente, el pool estudiado es rico en enzimas pro-hemorrágicas. Este efecto produce daño tisular, pérdida de sangre que produce anemia, shock hipovolémico y muerte. El veneno produjo en los ratones limitada capacidad de movimiento, discomfort y grandes halos hemorrágicos en la zona dorsal. Estas consecuencias fueron significativamente menores en todos los ratones que recibieron tratamiento. Existen extractos de otras plantas que también inhiben la actividad hemorrágica de los venenos bothrópicos: *Mouriri pusa* [95], *Byrsonima crassa* [95], *Davilla elliptica* [95], *Strychnos pseudoquina* [95], *Connarus favosus* [96], *Bursera simaruba* [97], *Clusia torresii* [97], *Croton draco* [97], *Persea americana* [97], *Phoebe brenesii* [97], *Pimenta dioica* [97], *Sapindus saponaria* [97], *Smilax cuculmeca* [97] y *Virola koschnyi* [97]. Cabe recalcar, que la reducción de la actividad enzimática de SVMP no puede relacionarse lineal y directamente con la inhibición de la hemorragia, porque la azocaseína es un sustrato inespecífico [98]. Sin embargo, existe una importante inhibición enzimática en todos los tratamientos USet cuyos efectos se aprecian en los ensayos *in vivo* con una importante reducción del área de sangrado.

Por otro lado, existen efectos sistémicos del veneno producto de la sinergia de las toxinas y la acumulación de productos de desecho producidos por el daño tisular [99], como la letalidad. Encontramos un retraso en el tiempo de muerte y una mejor tasa de supervivencia con los diferentes tratamientos USet con actividad dosis-dependiente (Figura 2). La inhibición de tres familias de enzimas relacionadas con los efectos locales

y sistémicos de los venenos de *Bothrops spp* parece jugar un papel importante en la neutralización de la letalidad. Cuanto mayor sea la inhibición enzimática, mejor será la tasa de supervivencia. Sin embargo, ninguno de los tratamientos estudiados alcanza una tasa de supervivencia del 100%, incluso a dosis altas. En los estudios llevados con *Dracontium* tenemos extractos que previenen la muerte de los animales al 100% [47] y otros, aumentan la tasa de supervivencia con respecto al control [42,49] como los resultados obtenidos en este estudio. Existen otras plantas latinoamericanas no relacionadas filogenéticamente con *U. sagittifolia* que han demostrado neutralizaciones del 100% de la letalidad, como por ejemplo *Harpalyce brasiliensis* en el noreste de Brasil y la hierba mexicana *Brongniartia podalyrioides*, donde se obtiene el edunol, un pterocarpano derivado de la raíz de la planta que neutraliza los efectos letales del veneno crudo de *B. jararacussu* y el veneno de *B. atrox* [100,101].

Los componentes de los tubérculos de *U. sagittifolia* difieren como los tubérculos de otras *Araeaceas* contienen taninos, compuestos fenólicos, esteroides, triterpenos y compuestos como el oxalato de calcio [47,102,103]. Estos componentes herbales juegan un papel central en la inhibición de los efectos sistémicos y locales del envenenamiento [101]. Algunos de ellos están relacionados con la quelación de átomos metálicos como Ca^{+} y Zn^{+} , que son cofactores esenciales para la actividad enzimática [104–106]. Con base en la literatura, creemos que los extractos de USet contienen estos metabolitos que le dan sus propiedades de inhibición.

Finalmente, la electroforesis SDS-PAGE muestra los componentes del veneno, el extracto y los diferentes tratamientos USet para ver si las proteínas, forman complejos, se precipitan o se degradan durante la incubación. Las bandas de proteína del veneno se conservan en todos los tratamientos, excepto en la muestra con mayor dosis (VE4). La conservación de las bandas de veneno en las muestras incubadas con USet significa que el extracto inhibe las enzimas, no las degrada. Sin embargo, la banda relacionada con SVSP va perdiendo pigmentación a medida que la proporción USet es más alta, acompañada con la aparición de dos bandas de 72 y 35 kDa. La presencia de proteínas con mayor peso molecular en los tratamientos USet indica la formación de complejos proteínicos por la interacción veneno-extracto. Por otro lado, es posible que las dosis más altas produzcan sus efectos por una inhibición enzimática en conjunto con la degradación estructural de las serin proteinasas, dado que se hallaron proteínas con menor peso molecular únicamente en los tratamientos. Otra hipótesis para este fenómeno, y por la que nos decantamos, es la precipitación de proteínas del veneno

como se describe en Vale et al. [107], donde ciertas concentraciones altas de extracto de la planta *Schizolobium parahyba*, generan desestabilización de las cargas de la proteína. Estos resultados preliminares nos ayudan a demostrar que existen interacciones veneno-extracto, aunque los mecanismos exactos necesitan ser elucidados en estudios posteriores.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El extracto etanólico de *U. sagittifolia* (Rudge) Schott protege a los ratones de los efectos letales, hemorrágicos e inflamatorios del veneno de *B. atrox* y produce inhibición enzimática de fosfolipasas, serin proteasas y metaloproteasas.
- La capacidad neutralizante de veneno bothrópico de los extractos de *U. sagittifolia* parece ser por inhibición enzimática.
- Se debe estudiar la capacidad antiveneno del extracto sin incubación y con la inyección del extracto post-veneno para simular experiencias en campo.
- Se recomienda estudiar el sinergismo el extracto y el antivenenos de proteínas heterólogas para determinar si existe una mejoría en los efectos locales y sistémicos.
- Se debe realizar investigación futura para elucidar los metabolitos activos de *U. sagittifolia* responsables de la inhibición y neutralización de las toxinas del veneno de *B. atrox*.
- La cantidad de plantas descritas etnobotánicamente para el tratamiento de mordeduras de serpientes es abundante. Se recomienda seguir continuando esta línea de investigación que busca dar bases científicas al conocimiento botánico ancestral y propiciar el descubrimiento de moléculas activas que permitan un tratamiento alternativo de las mordeduras de serpiente.

REFERENCIAS

1. DeGroot J. *Bothrops atrox*. 2000 [cited 18 Mar 2019]. Available: https://animaldiversity.org/accounts/Bothrops_atrox/
2. Salazar-Valenzuela D, Carvajal-Campos A. *Bothrops atrox*. In: Pontificia Universidad Católica del Ecuador [Internet]. [cited 27 Feb 2022]. Available: [https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrops atrox](https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrops_atrox)
3. Amazonia S, Pereira T, Moura VM De, Yamille L, Souza A De, Sousa L, et al. Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp.: uma revisão da literatura. 2017; 36–57.
4. The reptile database. *Bothrops atrox*. 2022 [cited 26 Mar 2022]. Available: <https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=bothrops&species=atrox>
5. Sant’Ana Malaque CM, Gutiérrez JM, María Gutiérrez J, Maria Sant C, Malaque A. Snakebite Envenomation in Central and South America. Snakebite envenomation Cent South Am Crit Care Med. 2015; 1–22. doi:10.1007/978-3-319-20790-2_146-1
6. Resiere D, Monteiro W, Houcke S, Pujo JM, Mathien C, Mayence C, et al. Bothrops Snakebite Envenomings in the Amazon Region. Curr Trop Med Reports 2020 72. 2020;7: 48–60. doi:10.1007/S40475-020-00203-4
7. Santacruz-Ortega, P., Salazar-Valenzuela D. Envenenamiento por mordeduras de serpientes en Ecuador. In: Pontificia Universidad Católica del Ecuador [Internet]. 2020. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/Ofidismo>
8. Kanashiro MM, De Escocard RCM, Petretski JH, Prates M V., Alves EW, Machado OLT, et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. Biochem Pharmacol. 2002;64: 1179–1186. doi:10.1016/S0006-2952(02)01288-1
9. Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. J Proteomics. 2009;73: 57–78. doi:10.1016/J.JPROT.2009.07.013
10. Patiño RSPP, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar E, Mendes B, Proaño-Bolaños C, da Silva SL, et al. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. Toxicon. 2021;193: 63–72. doi:10.1016/J.TOXICON.2021.01.007
11. Guércio RAP, Shevchenko A, Shevchenko A,s López-Lozano JL, Paba J, Sousa M V., et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. Proteome Sci. 2006;4: 11. doi:10.1186/1477-5956-4-11
12. Amazonas DR, Portes-Junior JA, Nishiyama-Jr MY, Nicolau CA, Chalkidis HM, Mourão RHV, et al. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. J Proteomics. 2018;181: 60–72. doi:10.1016/j.jprot.2018.03.032
13. Sasa M. Can diet explain intraspecific venom variation?: Reply. Toxicon. 1999;37: 259–260. doi:10.1016/S0041-0101(98)00123-8
14. Bermúdez-Méndez E, Fuglsang-Madsen A, Føns S, Lomonte B, Gutiérrez JM, Laustsen AH. Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. Toxins (Basel). 2018;10. doi:10.3390/TOXINS10110452
15. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 1991;29: 1279–1303. doi:10.1016/0041-0101(91)90116-9

16. De Silva HA, Ryan NM, De Silva HJ. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81: 446–452. doi:10.1111/bcp.12739
17. Huang CY, Hung DZ, Chen WK. Antivenin-related Serum Sickness. *J Chinese Med Assoc*. 2010;73: 540–542. doi:10.1016/S1726-4901(10)70117-9
18. Isbister GK, Duffull SB, Brown SGA. Failure of antivenom to improve recovery in Australian snakebite coagulopathy. *QJM*. 2009;102: 563–568. doi:10.1093/QJMED/HCP081
19. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura Á, Vargas M, et al. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins* 2017, Vol 9, Page 163. 2017;9: 163. doi:10.3390/TOXINS9050163
20. Mora-Obandoid D, Plaid D, Lomonteid B, Guerrero-Vargasid JA, Ayerbe S, Calveteid JJ. Antivenomics and in vivo preclinical efficacy of six latin american antivenoms towards Southwestern Colombian *Bothrops asper* lineage venoms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15: 1–36. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0009073
21. Gonçalves LRC, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2000;9: 101. doi:10.1080/096293500411569
22. Delafontaine M, Villas-Boas IM, Mathieu L, Josset P, Blomet J, Tambourgi D V. Enzymatic and Pro-Inflammatory Activities of *Bothrops lanceolatus* Venom: Relevance for Envenomation. *Toxins* (Basel). 2017;9. doi:10.3390/TOXINS9080244
23. Prado NDR, Pereira SS, Da Silva MP, Morais MSS, Kayano AM, Moreira-Dill LS, et al. Inhibition of the Myotoxicity Induced by *Bothrops jararacussu* Venom and Isolated Phospholipases A2 by Specific Camelid Single-Domain Antibody Fragments. *PLoS One*. 2016;11. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0151363
24. Alangode A, Rajan K, Nair BG. Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochem Pharmacol*. 2020;181: 114135. doi:10.1016/J.BCP.2020.114135
25. Silva A, Isbister GK. Current research into snake antivenoms, their mechanisms of action and applications. *Biochem Soc Trans*. 2020;48: 537–546. doi:10.1042/BST20190739
26. Visser LE, Kyei-Faried S, Belcher DW, Geelhoed DW, van Leeuwen JS, van Roosmalen J. Failure of a new antivenom to treat *Echis ocellatus* snake bite in rural Ghana: the importance of quality surveillance. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102: 445–450. doi:10.1016/J.TRSTMH.2007.11.006
27. Pla D, Sanz L, Quesada-Bernat S, Villalta M, Baal J, Chowdhury MAW, et al. Phylovenomics of *Daboia russelii* across the Indian subcontinent. Bioactivities and comparative in vivo neutralization and in vitro third-generation antivenomics of antivenoms against venoms from India, Bangladesh and Sri Lanka. *J Proteomics*. 2019;207. doi:10.1016/J.JPROT.2019.103443
28. Knudsen C, Laustsen AH. Recent Advances in Next Generation Snakebite Antivenoms. *Trop Med Infect Dis*. 2018;3. doi:10.3390/TROPICALMED3020042
29. Aoki-Shioi N, M. Modahl C. Snakebite Therapeutics Based on Endogenous Inhibitors from Vipers. *Med Toxicol*. 2021. doi:10.5772/INTECHOPEN.90625
30. LIPPS B V. Anti-lethal factor from opossum serum is a potent antidote for animal, plant and bacterial toxins. *J Venom Anim Toxins*. 1999;5: 56–66. doi:10.1590/S0104-79301999000100005
31. Thwin MM, Samy RP, Satyanarayanajois SD, Gopalakrishnakone P. Venom neutralization by purified bioactive molecules: Synthetic peptide derivatives of the endogenous PLA2 inhibitory protein PIP (a mini-review). *Toxicon*. 2010;56: 1275–1283. doi:10.1016/J.TOXICON.2009.12.023
32. Huang KF, Hung CC, Wu SH, Chiou SH. Characterization of three endogenous peptide inhibitors for multiple metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the venom of Taiwan habu

- (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248: 562–568. doi:10.1006/BBRC.1998.9017
33. Yee KT, Pitts M, Tongyoo P, Rojnuckarin P, Wilkinson MC. Snake Venom Metalloproteinases and Their Peptide Inhibitors from Myanmar Russell's Viper Venom. *Toxins (Basel).* 2017;9. doi:10.3390/TOXINS9010015
 34. Wagstaff SC, Favreau P, Cheneval O, Laing GD, Wilkinson MC, Miller RL, et al. Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;365: 650–656. doi:10.1016/J.BBRC.2007.11.027
 35. Lewin M, Samuel S, Merkel J, Bickler P. Varespladib (LY315920) Appears to Be a Potent, Broad-Spectrum, Inhibitor of Snake Venom Phospholipase A2 and a Possible Pre-Referral Treatment for Envenomation. *Toxins (Basel).* 2016;8. doi:10.3390/TOXINS8090248
 36. Lewin MR, Gilliam LL, Gilliam J, Samuel SP, Bulfone TC, Bickler PE, et al. Delayed LY333013 (Oral) and LY315920 (Intravenous) Reverse Severe Neurotoxicity and Rescue Juvenile Pigs from Lethal Doses of *Micrurus fulvius* (Eastern Coral Snake) Venom. *Toxins* 2018, Vol 10, Page 479. 2018;10: 479. doi:10.3390/TOXINS10110479
 37. Bittenbinder MA, Zdenek CN, Op Den Brouw B, Youngman NJ, Dobson JS, Naude A, et al. Coagulotoxic Cobras: Clinical Implications of Strong Anticoagulant Actions of African Spitting *Naja* Venoms That Are Not Neutralised by Antivenom but Are by LY315920 (Varespladib). *Toxins (Basel).* 2018;10. doi:10.3390/TOXINS10120516
 38. Wang Y, Zhang J, Zhang D, Xiao H, Xiong S, Huang C. Exploration of the Inhibitory Potential of Varespladib for Snakebite Envenomation. *Molecules.* 2018;23. doi:10.3390/MOLECULES23020391
 39. Escalante T, Franceschi A, Rucavado A, Gutiérrez JM. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochem Pharmacol.* 2000;60: 269–274. doi:10.1016/S0006-2952(00)00302-6
 40. Rucavado A, Escalante T, Gutiérrez JM. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: Understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon.* 2004;43: 417–424. doi:10.1016/j.toxicon.2004.01.016
 41. Das K. Medicinal Plants for Snake Bite Treatment-Future Focus. *Ethnobot Leaflet.* 2009;13: 508–529.
 42. Giovannini P, Howes MJR. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *J Ethnopharmacol.* 2017;199: 240–256. doi:10.1016/j.jep.2017.02.011
 43. Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol.* 2000;71: 505–511. doi:10.1016/S0378-8741(99)00197-X
 44. Félix-Silva J, Silva-Junior AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MDF. Medicinal Plants for the Treatment of Local Tissue Damage Induced by Snake Venoms: An Overview from Traditional Use to Pharmacological Evidence. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/5748256
 45. Mukherjee AK, Doley R, Saikia D. Isolation of a snake venom phospholipase A2 (PLA2) inhibitor (AIPLAI) from leaves of *Azadirachta indica* (Neem): mechanism of PLA2 inhibition by AIPLAI in vitro condition. *Toxicon.* 2008;51: 1548–1553. doi:10.1016/J.TOXICON.2008.03.021
 46. da Costa Guimarães N, Freitas-de-Sousa LA, Scheffer de Souza MC, Oliveira de Almeida PD, Dos-Santos MC, Nunez CV, et al. Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant

- potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. *Toxicon*. 2020;184: 99–108. doi:10.1016/J.TOXICON.2020.05.024
47. Caro D, Ocampo Y, Castro J, Barrios L, Salas R, Franco LA. Protective effect of *Dracontium dubium* against *Bothrops asper* venom. *Biomed Pharmacother*. 2017;89: 1105–1114. doi:10.1016/J.BIOPHA.2017.02.080
 48. Lovera, A., Bonilla, C., Hidalgo J. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *Dracontium lorentense* (JERGÓN SACHA) sobre la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2006;23: 177–181. Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342006000300007
 49. Bhattacharjee P, Bhattacharyya D. Medicinal plants as snake venom antidotes. *J Exp Appl Anim Sci*. 2014;1: 156–181. doi:10.20454/jeas.2013.745
 50. Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. *J Ethnopharmacol*. 2000;71: 493–504. doi:10.1016/S0378-8741(00)00243-9
 51. Omara T, Kagoya S, Openy A, Omute T, Ssebulime S, Kiplagat KM, et al. Antivenin plants used for treatment of snakebites in Uganda: ethnobotanical reports and pharmacological evidences. *Trop Med Health*. 2020;48. doi:10.1186/S41182-019-0187-0
 52. Bala AA, Mohammed M, Umar S, Ungogo MA, Hassan MAK, Abdussalam US, et al. Preclinical efficacy of African medicinal plants used in the treatment of snakebite envenoming: a systematic review protocol: <https://doi.org/101177/20499361211072644>. 2022;9. doi:10.1177/20499361211072644
 53. Omara T. Plants Used in Antivenom Therapy in Rural Kenya: Ethnobotany and Future Perspectives. *J Toxicol*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/1828521
 54. Upasani S V., Beldar VG, Tatiya AU, Upasani MS, Surana SJ, Patil DS. Ethnomedicinal plants used for snakebite in India: a brief overview. *Integr Med Res*. 2017;6: 114. doi:10.1016/J.IMR.2017.03.001
 55. Dey A, De JN. Traditional Use of Plants Against Snakebite in Indian Subcontinent: A Review of the Recent Literature. *African J Tradit Complement Altern Med*. 2012;9: 153. doi:10.4314/AJTCAM.V9i1.20
 56. Royal Botanic Gardens. *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott | Plants of the World Online | . In: Kew Science [Internet]. 2017 [cited 28 Feb 2022]. Available: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:89296-1>
 57. Winterton S, Scher J, Burnett J, Redford A. *Urospatha sagittifolia*. In: Plants of the World [Internet]. 2018 [cited 28 Feb 2022]. Available: <http://idtools.org/id/appw/factsheet.php?name=16106>
 58. DeFilipps RR, Maina S, Crepin J. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). *Histoire*. Washington D.C.: Dept. of Botany National Museum of Natural History Smithsonian Institution; 2004.
 59. Moreno S. Caracterización de plantas amazónicas con actividad antiofídica por análisis químico. Universidad Técnica de Ambato. 2022. Available: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34290/1/t1942mqum.pdf>
 60. de Souza JF, de Oliveira EC, da Silva ACR, da Silva VP, Coelho Kaplan MA, Figueiredo MR, et al. Potential use of extract of the plant *Schwartzia brasiliensis* (choisy) bedell ex gir.-Cañas against the toxic effects of the venom of *Bothrops jararaca* or *B. jararacussu*. *Biomed Pharmacother*. 2020;125: 109951. doi:10.1016/J.BIOPHA.2020.109951
 61. Barani Kumar R, Xavier Suresh M. Computational analysis of bioactive phytochemicals as potential inhibitors for calcium activated potassium channel blocker, tamulotoxin from *Mesobuthus*

tamulus. Pharmacogn J. 2013;5: 41–45. doi:10.1016/J.PHCGJ.2013.02.001

62. Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Ricardo HD, Cons BL, Fernandes FFAA, et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. J Ethnopharmacol. 2013;145: 50–58. doi:10.1016/J.JEP.2012.10.033
63. Henrique F, Vale L, M. Mendes M, S. Fernandes R, R. Costa T, I. S.Hage-Melim L, A. Sousa M, et al. Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. Curr Top Med Chem. 2011;11: 2566–2577. doi:10.2174/156802611797633438
64. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Saparpakorn P. Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai mango seed kernel extract. Molecules. 2009;14: 3198–3213. doi:10.3390/MOLECULES14093198
65. Girish KS, Kemparaju K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. Biochemistry (Mosc). 2005;70: 948–952. doi:10.1007/S10541-005-0207-Z
66. Guimaraes C, Moreira-Dill L, Fernandes R, Costa T, Hage-Melim L, Marcussi S, et al. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. Curr Med Chem. 2014;21: 2952–2979. doi:10.2174/09298673113206660295
67. Paul R, Animesh DK, Mandal A, Benoy GK, Halder S. Snake bite, snake venom, anti-venom and herbal antidote - a review. Int J Res Ayurveda Pharm. 2011;2: 1060–1067. Available: <http://www.ijrap.net/archive-issue.php?issueid=9>
68. Praba-Egge AD, Cone SW, Araim O, Freire I, Paidá G, Escalante J, et al. Snakebites in the rainforests of Ecuador. World J Surg. 2003;27: 234–40. doi:10.1007/s00268-002-6552-9
69. WHO. Snakebite envenoming. In: World Health Organization [Internet]. 2021 [cited 24 Mar 2022]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
70. Waidyanatha S, Silva A, Siribaddana S, Isbister GK. Long-term Effects of Snake Envenoming. Toxins (Basel). 2019;11. doi:10.3390/TOXINS11040193
71. Vaiyapuri S, Vaiyapuri R, Ashokan R, Ramasamy K, Nattamaisundar K, Jeyaraj A, et al. Snakebite and Its Socio-Economic Impact on the Rural Population of Tamil Nadu, India. PLoS One. 2013;8: e80090. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0080090
72. MSP. Manejo clínico del envenenamiento por mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Dir Nac Prevención y Control y Dir Nac Normatización. 2017.
73. MSP. Subsecretaría de vigilancia de la salud pública subsistema de vigilancia sive-alerta efectos tóxicos 2021. Minist Salud Pública. 2021 [cited 24 Mar 2022]. Available: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/04/Toxicos-y-quimicos-SE-14.pdf>
74. Hifumi T, Sakai A, Kondo Y, Yamamoto A, Morine N, Ato M, et al. Venomous snake bites: Clinical diagnosis and treatment. J Intensive Care. 2015;3: 1–9. doi:10.1186/s40560-015-0081-8
75. Gupta Y, Peshin S. Do herbal medicines have potential for managing snake bite envenomation? Toxicol Int. 2012;19: 89. doi:10.4103/0971-6580.97194
76. Rahman Sajon S, Sana S, Rana S, Sadiur Rahman Sajon C. Anti-venoms for snake bite: A synthetic and traditional drugs review. J Pharmacogn Phytochem JPP. 2017;6: 190–197. Available: <http://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue3/PartC/6-2-27-792.pdf>
77. Velandia-Pardo Da. Evaluación de la actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de *Dracontium croatii*. 2009; 1–77. Available: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8469/1/192529.2009.pdf>
78. Bhattacharjee P, Bera I, Chakraborty S, Ghoshal N, Bhattacharyya D. Aristolochic acid and its derivatives as inhibitors of snake venom L-amino acid oxidase. Toxicon. 2017;138: 1–17. doi:10.1016/J.TOXICON.2017.08.003

79. Vishwanath BS, Gowda TV. Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A2: its effect on enzymatic and pathological activities. *Toxicon*. 1987;25: 929–937. doi:10.1016/0041-0101(87)90155-3
80. Fernandes CAH, Cardoso FF, Cavalcante WGL, Soares AM, Dal-Pai M, Gallacci M, et al. Structural Basis for the Inhibition of a Phospholipase A2-Like Toxin by Caffeic and Aristolochic Acids. *PLoS One*. 2015;10: e0133370. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0133370
81. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020;83: 770–803. doi:10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285/SUPPL_FILE/NP9B01285_SI_009.PDF
82. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20: 200–216. doi:10.1038/S41573-020-00114-Z
83. Bonfim VL, De Carvalho DD, Ponce-Soto LA, Kassab BH, Marangoni S. Toxicity of phospholipases A2 D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. *Cell Biol Toxicol* 2008 256. 2008;25: 523–532. doi:10.1007/S10565-008-9106-6
84. Gutiérrez J, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 1995;33: 1405–1424. doi:10.1016/0041-0101(95)00085-Z
85. Laustsen AH, María Gutiérrez J, Knudsen C, Johansen KH, Bermúdez-Méndez E, Cerni FA, et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*. 2018;146: 151–175. doi:10.1016/J.TOXICON.2018.03.004
86. Rojas G, Jiménez J, Gutiérrez J. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 1994;32: 351–363. doi:10.1016/0041-0101(94)90087-6
87. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63: 3030–3041. doi:10.1007/S00018-006-6315-0
88. Laustsen AH. Toxin synergism in snake venoms. <http://dx.doi.org/101080/1556954320161220397>. 2016;35: 165–170. doi:10.1080/15569543.2016.1220397
89. Cavalcante WLG, Campos TO, Dal Pai-Silva M, Pereira PS, Oliveira CZ, Soares AM, et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J Ethnopharmacol*. 2007;112: 490–497. doi:10.1016/J.JEP.2007.04.002
90. Vander dos Santos R, Villalta-Romero F, Stanisic D, Borro L, Neshich G, Tasic L. Citrus bioflavonoid, hesperetin, as inhibitor of two thrombin-like snake venom serine proteases isolated from *Crotalus simus*. *Toxicon*. 2018;143: 36–43. doi:10.1016/J.TOXICON.2018.01.005
91. da Silva JO, Fernandes RS, Ticli FK, Oliveira CZ, Mazzi M V., Franco JJ, et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*. 2007;50: 283–291. doi:10.1016/J.TOXICON.2007.03.024
92. Shenoy PA, Nipate SS, Sonpetkar JM, Salvi NC, Waghmare AB, Chaudhari PD. Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. *J Ethnopharmacol*. 2013;147: 373–382. doi:10.1016/J.JEP.2013.03.022
93. Ticli FK, Hage LIS, Cambraia RS, Pereira PS, Magro ÂJ, Fontes MRM, et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*. 2005;46: 318–327. doi:10.1016/J.TOXICON.2005.04.023
94. Badilla B, Chaves F, Mora G, Poveda L. Edema induced by *Bothrops asper* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plant extracts. *Rev Biol Trop*. 2006;54. Available:

95. Nishijima CM, Rodrigues CM, Silva MA, Lopes-Ferreira M, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Anti-hemorrhagic Activity of Four Brazilian Vegetable Species Against *Bothrops jararaca* Venom. Mol 2009, Vol 14, Pages 1072-1080. 2009;14: 1072–1080. doi:10.3390/MOLECULES14031072
96. Silva TP Da, Moura VM De, Souza MCS De, Santos VNC, Silva KAMM Da, Mendes MGG, et al. *Connarus favosus* Planch.: An inhibitor of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. J Ethnopharmacol. 2016;183: 166–175. doi:10.1016/J.JEP.2016.02.043
97. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E. [Neutralization of the hemorrhagic effect induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) venom with tropical plant extracts]. Rev Biol Trop. 1999;47: 605–616. doi:10.15517/rbt.v47i3.19215
98. SLS. Azocasein, protease substrate . In: Scientific Laboratory Supplies [Internet]. 2022 [cited 25 Mar 2022]. Available: <https://www.scientificlabs.co.uk/product/A2765-5G#overview>
99. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon. 2009;54: 976–987. doi:10.1016/J.TOXICON.2009.01.039
100. Carvalho BMAA, Santos JDLL, Xavier BM, Almeida JR, Resende LM, Martins W, et al. Snake venom PLA2s inhibitors isolated from brazilian plants: Synthetic and natural molecules. Biomed Res Int. 2013;2013. doi:10.1155/2013/153045
101. Mors WB, Célia Do Nascimento M, Ruppelt Pereira BM, Alvares Pereira N. Plant natural products active against snake bite--the molecular approach. Phytochemistry. 2000;55: 627–642. doi:10.1016/S0031-9422(00)00229-6
102. Zhong LY, Wu H, Zhang KW, Wang QR. Study on irritation of calcium oxalate crystal in raw *Pinellia ternata*. Zhongguo Zhongyao Zazhi. 2006;31: 1706–1710.
103. Díaz Collantes, I.E., Gonçalves E.G. MY. C onstituyentes químicos del túbero de *Dracontium spruceanum* (Schott) G . Zhu ex *Dracontium lorentense* Krause (Araceae). Rev Soc Quim Perú. 2011;77: 117–126.
104. Otero R, Nuñez V, Osorio RG, Gutiérrez J, Giraldo CA, Posada LE. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapaná equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). Toxicon. 1995;33: 809–815. doi:10.1016/0041-0101(95)00009-B
105. Núñez V, Otero R, Barona J, Saldarriaga M, Osorio R, Fonnegra R. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. Braz J Med Biol Res. 2004;37: 969–977.
106. De Oliveira EC, Fernandes CP, Sanchez EF, Rocha L, Fuly AL. Inhibitory effect of plant *Manilkara subsericea* against biological activities of *Lachesis muta* snake venom. Biomed Res Int. 2014;2014. doi:10.1155/2014/408068
107. Vale LHF, Mendes MM, Hamaguchi A, Soares AM, Rodrigues VM, Homs-Brandeburgo MI. Neutralization of pharmacological and toxic activities of bothrops snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;103: 104–107. doi:10.1111/J.1742-7843.2008.00248.X