



---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Influencia de la vía de administración en la  
capacidad neutralizante *in vivo* de dos  
antivenenos**

### T E S I S

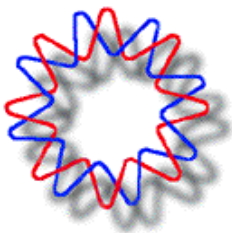
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MESTRA EN CIENCIAS**

### P R E S E N T A

L.F. Irene Vergara Bahena

Asesor

Dr. Alejandro Alagón Cano



Cuernavaca, Morelos. Junio de 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por la instrucción académica que recibí durante el desarrollo de este proyecto y por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

Al Instituto Bioclon, S.A de C.V por la donación de antivenenos para el desarrollo del proyecto.

Al CONACyT por la beca otorgada durante la maestría.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, por la dirección del proyecto y por las excelentes y acertadas observaciones durante la realización del mismo.

A los técnicos Felipe Olvera Rodríguez y Carlos Olvera Rodríguez, por el apoyo brindado durante la realización del proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, los Drs. Lourival Possani Postay y Jorge Paniagua Solís, por los acertados comentarios que contribuyeron en la realización y enriquecimiento del proyecto.

A todos los miembros del jurado de tesis, por haber dedicado parte de su tiempo a la revisión de este trabajo y por los comentarios y correcciones que contribuyeron a mejorar el mismo.

## **DEDICATORIAS:**

Al Doc Alagón por la confianza que me tuvo para desarrollar este proyecto en su laboratorio, por todo el aprendizaje académico a lo largo de estos dos años y sobre todo, por la gran lección que he aprendido de él, ya que además de ser un gran investigador, reconocido por sus méritos académicos y por el aporte de sus investigaciones a este país y la humanidad, sigue conservando su gran calidad humana.

A mis hijos Mitzi y Guillermo porque siempre están conmigo apoyándome en todas aquéllas cosas que me hacen feliz como persona y como profesional; y por todo el amor que me regalan cada día, el cual, impulsa mis ganas de seguir intentando subir un escalón más en la meta que me he trazado.

A mi esposo por todo el apoyo que me ha brindado durante mi desarrollo profesional y por el amor y comprensión en todo momento.

A mi mamá por ser la persona que me ha querido, cuidado y apoyado en cada una de las etapas de mi vida de manera incondicional, y que siempre ha estado ahí para aconsejarme y ayudarme aún cuando me he equivocado. Mamita sabes que cada paso y cada triunfo de mi vida te lo dedico a ti con mucho amor.

A toda mi familia, que siempre me regalan sus sonrisas y apoyo cuando lo necesito.

Y a todas mis amigas que son cómplices de mis locuras y la pimienta de mi vida.

"No basta dar pasos que puedan conducir hasta la meta; sino que cada paso sea una meta, sin dejar de ser un paso".

Johann Peter Eckermann.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>	
I	ÍNDICE.	i
II	LISTA DE ABREVIATURAS.	iv
III	LISTA DE FIGURAS.	vi
IV	LISTA DE TABLAS.	vii
V	LISTA DE GRÁFICAS.	ix
VI	RESUMEN.	x
1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	ANTECEDENTES.	2
2.1	El alacrán y su veneno.	2
2.2	El alacranismo en México.	3
2.3	Canales iónicos como blanco de toxinas.	5
2.3.1	Canal de sodio.	6
2.3.2	Canal de potasio voltaje dependiente.	8
2.4	Envenenamientos causados por serpientes.	9
2.4.1	Vipéridos.	10
2.4.1.1	<i>Crotalus atrox</i> .	10
2.4.1.2	Metaloproteinasas.	13
2.4.1.3	Fosfolipasa A2.	14
2.5	Antivenenos.	15
2.5.1	Antivenenos en México.	18
2.6	Vías de administración.	19
3.	JUSTIFICACIÓN.	22
4.	HIPÓTESIS.	23
5.	OBJETIVO GENERAL.	25

5.1 Objetivos particulares.	23
6. MATERIALES Y EQUIPOS.	24
6.1 Venenos.	24
6.2 Antivenenos.	24
6.3 Modelo animal.	24
6.4 Material de inoculación.	24
6.5 Equipos	24
7. MÉTODOLÓGÍA.	25
7.1 Recuperación del veneno fresco de <i>C. limpidus</i> .	25
7.2 Preparación del stock de los venenos de <i>C. limpidus</i> y <i>C. atrox</i> .	25
7.3 Determinación de la $DL_{50I.V}$ de los venenos <i>C. limpidus</i> y <i>C. atrox</i> .	25
7.4 Determinación de la $DL_{50S.C}$ de los venenos <i>C. limpidus</i> y <i>C. atrox</i> .	26
7.5 Determinación de la concentración proteica de Alacramyn y Antivipmyn.	26
7.6 DE50 de Alacramyn preincubando veneno-antiveneno.	26
7.7 Ensayo de rescate con Alacramyn por vía I.V.	28
7.8 Ensayo de rescate con Alacramyn por vía I.P.	28
7.9 Ensayo de rescate con Alacramyn por vía I.M.	29
7.10 Ensayo de rescate con Alacramyn por vía S.C.	29
7.11 DE50 de Antivipmyn preincubando veneno-antiveneno.	29
7.12 Ensayo de rescate con Antivipmyn por vía I.V.	30
7.13 Ensayo de rescate con Antivipmyn por vía I.P.	30
7.14 Ensayo de rescate con Antivipmyn por vía S.C.	31
7.15 Ensayo de rescate con Antivipmyn por vía I.M.	31

8. RESULTADOS.	32
8.1 Alacramyn® vs <i>C. limpidus</i> .	32
8.1.1 Determinación de la concentración del veneno de <i>C. limpidus</i> .	32
8.1.2 Determinación de la letalidad del veneno de <i>C. limpidus</i> .	34
8.1.3 Neutralización preincubando veneno-antiveneno.	34
8.1.4 Ensayos de rescate por diferentes vías de administración.	35
8.2 Resumen de los ensayos de Alacramyn® vs <i>C. limpidus</i> .	44
8.3 Antivipmyn® vs <i>C. atrox</i> .	45
8.3.1 Determinación de la concentración del veneno de <i>C. atrox</i> .	45
8.3.2 Determinación de la letalidad del veneno de <i>C. atrox</i> .	45
8.3.3 Neutralización preincubando veneno-antiveneno.	47
8.3.4 Ensayos de rescate por diferentes vías de administración.	48
8.3.5 Resumen de los ensayos de Antivipmyn® vs <i>C. atrox</i> .	61
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	62
10. CONCLUSIONES.	67
11. REFERENCIAS.	68
12. APÉNDICE 1	71
13. APÉNDICE 2	72



## II LISTA DE ABREVIATURAS.

Absorbancia.	A
Antiveneno.	AV
Centímetros.	cm
<i>Centruroides limpidus.</i>	<i>C. limpidus</i>
<i>Crotalus atrox.</i>	<i>C. atrox</i>
Dirección general de epidemiología.	DGE
Dos fragmentos de inmunoglobulina G unidos.	F(ab') <sub>2</sub>
Dosis efectiva media.	DE <sub>50</sub>
Dosis letal media.	DL <sub>50</sub>
Especies	<i>sp.</i>
Fosfolipasa A2.	PLA2
Fragmento de inmunoglobulina.	Fab
Horas.	h
Intramuscular.	I.M.
Intraperitoneal.	I.P.
Intravenosa.	I.V.
Ión calcio.	Ca <sup>++</sup>
Ión cloro.	Cl <sup>-</sup>
Ión potasio.	K <sup>+</sup>
Ión sodio.	Na <sup>+</sup>
kilo Daltones.	kDa
Microgramos.	mcg
Microlitros.	mcl
Miligramos.	mg

*Influencia de la vía de administración en la capacidad neutralizante in vivo de dos antivenenos.*

Mililitros.	mL
Milímetros.	mm
Milimolar.	mM
Minutos.	min
Nanómetros.	nm
Noxiustoxina.	NTX
Secretaría de Salud.	SSA
Subcutánea.	S.C.
Veneno.	V
Enzime-Linked Immuno Sorbent Assay	ELISA

### III LISTA DE FIGURAS.

1a. Mapa de distribución de siete especies del género <i>Centruroides</i> en México.	3
1b. Mapa de distribución de tres especies del género <i>Centruroides</i> en México.	4
2. Estructura del canal de sodio voltaje dependiente.	6
3. Sitios de unión de algunas toxinas sobre el canal de sodio.	7
4. Formas en las que pueden actuar las toxinas de alacrán sobre algunos canales de potasio.	8
5. Fotografía de un ejemplar de <i>C. atrox</i> .	11
6. Mapa de distribución de <i>C. atrox</i> .	12
7. Estructura general de las inmunoglobulinas tipo IgG.	16
8. Digestión enzimática de una inmunoglobulina.	17
9. Ejemplo de la curva dosis-respuesta.	26

#### IV LISTA DE TABLAS.

1.	Determinación de la $DL_{50I.V.}$ del veneno <i>C. limpidus</i> .	32
2.	Determinación de la $DL_{50S.C}$ de <i>C. limpidus</i> .	33
3.	$DE_{50}$ del Alacramyn® preincubando con el equivalente a $3DL_{50I.V.}$	34
4.	$DE_{50}$ del Alacramyn® preincubando con el equivalente a $2DL_{50I.V.}$	35
5.	Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía intravenosa.	36
6.	Tiempo de muerte en el rescate I.V. con Alacramyn®.	37
7.	Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía intraperitoneal.	38
8.	Tiempo de muerte en el rescate I.P. con Alacramyn®.	39
9.	Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía intramuscular.	40
10.	Tiempo de muerte en el rescate I.M. con Alacramyn®.	41
11.	Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía subcutánea.	42
12.	Tiempo de muerte en el rescate S.C. con Alacramyn®.	43
13.	Resumen de <i>C. limpidus</i> y Alacramyn®.	44
14.	Resumen de los ensayos de rescate Alacramyn® vs <i>C. limpidus</i> .	44
15.	Determinación de la $DL_{50I.V.}$ de <i>C. atrox</i> .	45
16.	Determinación de la $DL_{50S.C.}$ de <i>C. atrox</i> .	46
17.	$DE_{50}$ del Antivipmyn® retando con el equivalente a $3DL_{50I.V.}$	47
18.	$DE_{50}$ del Antivipmyn® retando con el equivalente a $2DL_{50I.V.}$	48
19.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía I.V. retando con $3DL_{50S.C.}$	49
20.	Tiempo de muerte en el rescate I.V. retando con $3DL_{50S.C.}$	50
21.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía I.P. retando con $3DL_{50S.C.}$	51
22.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía S.C. retando con $3DL_{50S.C.}$	52
23.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía I.V. retando con $2DL_{50S.C.}$	53
24.	Tiempo de muerte en el rescate I.V. retando con $2DL_{50S.C.}$	54

25.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía I.P. retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	55
26.	Tiempo de muerte en el rescate I.P. con retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	56
27.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía S.C. retando con 2L <sub>50S.C.</sub>	57
28.	Tiempo de muerte en el rescate S.C. retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	58
29.	Ensayo de rescate con Antivipmyn® por vía I.M. retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	59
30.	Tiempo de muerte en el rescate I.M. retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	60
31.	Resumen de <i>C. atrox</i> y Antivipmyn®.	61
32.	Resumen de los ensayos de recate retando con 3DL <sub>50S.C.</sub>	61

V	LISTA DE GRÁFICAS.	
1.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.V. con Alacramyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	37
2.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.P. con Alacramyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	39
3.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.M. con Alacramyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	41
4.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate S.C. con Alacramyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	43
5.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.V. con Antivipmyn retando con 3DL <sub>50S.C.</sub>	50
6.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.V. con Antivipmyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	54
7.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.P. con Antivipmyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	56
8.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate S.C. con Antivipmyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	58
9.	Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.M. con Antivipmyn retando con 2DL <sub>50S.C.</sub>	60

## VI RESUMEN

Alrededor del mundo ocurren cada año miles de envenenamientos causados por animales ponzoñosos. En Estados Unidos, se reportan en promedio 8,000 casos de envenenamientos por mordedura de serpientes al año de los cuales, 1,200, se les atribuyen a serpientes de tipo cascabel (Mc Nally *et al.*, 2008). En México, el envenenamiento por piquete de alacrán sigue siendo un problema de salud pública, por los efectos que tiene el veneno sobre la víctima y, además, por el alto número de casos que se presentan por año. Tan solo, en el 2008 las instituciones de salud en México registraron a 271,976 personas que acudieron a recibir atención médica por piquete de alacrán (DGE/SSA). El tratamiento de primera elección en estos casos son los antivenenos, cuya composición puede ser inmunoglobulinas completas o fragmentos de ellas, generalmente de origen equino, con capacidad neutralizante contra el veneno para el cual se desarrollaron. La vía de administración recomendada es la intravenosa, dado que para ejercer el efecto terapéutico en el menor tiempo posible es necesaria su biodisponibilidad inmediata en torrente sanguíneo. Sin embargo, en algunas comunidades que no cuentan con centros de salud cercanos o con personal capacitado para la administración intravenosa, el antiveneno se administra por vía intramuscular en personas picadas por alacrán. No obstante, la eficacia de los antivenenos administrados por vías parenterales distintas a la intravenosa no ha sido bien estudiada, y existen discrepancias en cuanto a su efectividad por la vía intramuscular. Por lo cual, es necesario realizar estudios sistemáticos que contribuyan al conocimiento de su eficacia empleando distintas vías. Con este objetivo en el presente trabajo se realizaron experimentos para analizar la capacidad neutralizante en ensayos de rescate; por las vías intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.), intraperitoneal (I.P.) y subcutánea (S.C.), de los antivenenos Alacramyn<sup>®</sup> y Antivipmyn<sup>®</sup> utilizando grupos de seis ratones, de ambos sexos, de la cepa ICR-CD1 y con peso de 18 a 20 g. El Alacramyn<sup>®</sup> se utilizó contra el veneno de alacrán de la especie *Centruroides limpidus*, y el Antivipmyn<sup>®</sup> contra el veneno de serpiente de la especie *Crotalus atrox*.

La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del veneno de *C. limpidus* por las vías I.V. y S.C., fueron de 21 mcg/ratón (I.C 95% 17 a 25) y 31 mcg/ratón (I.C 95% 29 a 33) respectivamente. La dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) del Alacramyn, preincubando

2DL<sub>50I.V.</sub> O 3DL<sub>50I.V.</sub> de *C. limpidus* con distintas cantidades del antiveneno a 37 °C por 30 minutos, fueron: 0.21 mg/2DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95% 0.19 a 0.25) y 0.75 mg/3DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95% 0.73 a 0.76), respectivamente. En el rescate por las vías I.V., I.M., I.P. y S.C. se retó con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> de *C. limpidus* por vía S.C., y se rescató a los cinco minutos. Por las vías I.V. e I.P. las DE<sub>50s</sub>, en el mismo orden, fueron: 0.82 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 0.76 a 0.87) y 4.5 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 3.78 a 5.30). Cuando la administración fue I.M. o S.C. el rescate fue parcial, dado que en la primera, la sobrevivencia fue del 50% administrando hasta 8.4 mg/2DL<sub>50S.C.</sub>, y del 30% administrando hasta 10.7 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> para la segunda.

La DL<sub>50</sub> I.V. del veneno de *C. atrox* fue de 71 mcg/ratón (I.C 95% 64 a 78), y de 220 mcg/ratón (I.C 95% 202 a 240) por vía S.C. Las DE<sub>50s</sub> del Antivipmyn, preincubando a 37 °C por 30 minutos distintas cantidades de éste, con el equivalente a 3DL<sub>50I.V.</sub> O 2DL<sub>50I.V.</sub> de *C. atrox*, fueron: 1.85 mg/3DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95% 1.57 a 2.18) y 0.68 mg/2DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95% 0.61 a 0.74), respectivamente. Los ensayos de rescate con Antivipmyn se realizaron en dos series: la primera retando con el equivalente a 3DL<sub>50</sub> por vía S.C. y rescatando diez minutos después; por las vías I.V., I.P. y S.C. En estos experimentos sólo se determinó la DE<sub>50</sub> por la vía I.V., cuyo valor fue de 2.1 mg/3DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 1.40 a 3.13) ya que por las vías I.P. y S.C. sobrevivieron sólo el 30% de los ratones administrando hasta 46 y 36.80 mg, respectivamente. En la segunda serie sólo se modificó la cantidad del veneno de reto, a 2DL<sub>50S.C.</sub> Las DE<sub>50s</sub> I.V., I.P. y S.C. fueron, en ese orden: 0.81 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 0.70 a 0.93), 5.7 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 3.50 a 9.20), y 6.16 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 3.00 a 12.60). El rescate por vía I.M. fue parcial, dado que la sobrevivencia fue del 50% administrando hasta 27.6 mg del Antivipmyn.

En su conjunto, los resultados muestran que la capacidad neutralizante *in vivo* del Alacramyn<sup>®</sup> por vía I.V. fue cinco veces mayor que por vía I.P., la vía I.M. fue mejor que la S.C., porque se obtuvieron el 50 y 30% de sobrevida respectivamente. La neutralización con Antivipmyn<sup>®</sup> retando con 3DL<sub>50</sub> sólo se ocurre por vía I.V. Sin embargo, con 2DL<sub>50</sub>, esta es ~7 veces mayor por vía I.V. que por las vías I.P. y S.C., y por vía I.M. la sobrevivencia fue del 50% hasta con 34 veces más antiveneno.



## **1. INTRODUCCIÓN**

Los venenos de distintos grupos de animales surgieron en la evolución como parte de los mecanismos de defensa, así como también, para asegurar su alimentación. Estos contienen componentes que pueden desencadenar eventos que afectan procesos vitales tales como: la transmisión neuronal, la circulación sanguínea y la permeabilidad de las membranas, entre otros. Los venenos de animales ponzoñosos son mezclas heterogéneas de moléculas biológica y toxicológicamente activas. Los principales componentes con actividad tóxica en los venenos son las toxinas, algunas de ellas actúan sobre el sistema de transmisión colinérgica a diferentes niveles; mientras que otras son bloqueadores o moduladores de canales iónicos tales como: canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{++}$  (Catterall *et al.*, 2006).

En México los envenenamientos por el piquete de alacrán han sido, a lo largo de su historia, un problema de salud pública (Bourée *et al.*, 2005). Tan sólo para el año 2008 la Dirección General de Epidemiología reportó la atención de 271,976 casos de personas picadas por alacrán. Sin embargo, la mortalidad por este tipo de envenenamientos se redujo de manera considerable a partir de la aparición y progreso en el desarrollo de los antivenenos (DGE/SSA).

Actualmente, los antivenenos utilizados en México y en algunas otras partes del mundo, son el resultado del tratamiento proteolítico de inmunoglobulinas procedentes de caballos hiperinmunizados con el veneno de interés. Los fragmentos obtenidos poseen las regiones necesarias para la neutralización de las proteínas responsables del envenenamiento. Esta tecnología, ha permitido disminuir significativamente los efectos secundarios causados por los sueros completos que se utilizaron durante las primeras etapas de la antivenenoterapia. La vía de administración recomendada es la intravenosa, dado que, su biodisponibilidad en el organismo es completa e inmediata. Sin embargo, en algunos países de América Latina, tales como: México, Costa Rica y Guatemala existen reportes de personas picadas por alacrán o mordidas por serpientes, a las cuales, se les administró el antiveneno por vía intramuscular; debido a las grandes distancias que hay hasta el centro de salud, y a la falta de personal capacitado para la administración intravenosa, con aparentes resultados satisfactorios.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 El alacrán y su veneno.**

Los alacranes o escorpiones son artrópodos de la clase *Arachnidae*, la cual comprende más de 1000 especies de escorpiones alrededor del mundo y que se agrupan en seis familias: *Buthidae*, *Botriuridae*, *Chactidae*, *Diplocentridae*, *Scorpionidae*, y *Vejovidae*. No obstante que todos los escorpiones son venenosos, son menos de 50 las especies consideradas de importancia médica por el efecto de su veneno en el humano (Meier y White, 1995).

Los alacranes habitualmente inyectan su veneno de forma subcutánea y de ahí se distribuye rápidamente al resto del organismo a través del torrente sanguíneo. Al envenenamiento causado por el piquete de alacrán se le llama alacranismo.

Los primeros estudios clínicos acerca del envenenamiento por piquete de alacrán, se desarrollaron a mitad del siglo XX, y fueron principalmente observaciones de casos tratados con seroterapia (uso de suero completo de caballo hiperinmune que contiene anticuerpos neutralizantes contra el veneno de interés). Probablemente el primer reporte del mecanismo de acción de este tipo de envenenamiento, fue reportado por Hassan y Mohammed (1940) en Egipto, quienes sugirieron que el veneno de alacrán tenía efecto estimulador sobre el sistema nervioso autónomo.

Posteriormente hubieron otros estudios en Israel, Brasil, México y en el mismo Egipto (Ismail, 1994). Algunos efectos importantes que se observaron después del envenenamiento por piquete de alacrán, con distintas especies, fueron aquellos que afectan el sistema nervioso. También se ha visto que, en envenenamientos severos, que puede haber arritmias cardíacas, aumento en la presión arterial (hipertensión), e incluso infarto al miocardio. Otros efectos que se han observado son edema pulmonar y falla respiratoria.

## 2.2 El alacranismo en México.

El alacrán es uno de los animales ponzoñosos de mayor importancia médica en México por la cantidad de intoxicaciones que causan al año, siendo los de la especie *Centruroides* los responsables de estos accidentes (Figuras 1a y 1b). El género *Centruroides* pertenece a la familia *Buthidae*, así identificado, por Marx (1889) con base en sus características morfológicas. Las especies de este género se distribuyen en diferentes regiones de México. Por ejemplo: en Nayarit *C. noxius*, en Sinaloa y Durango *C. suffusus suffusus*, y *C. limpidus* en Guerrero, Puebla, Oaxaca, Estado de México y Morelos (Bourée *et al.*, 2005).

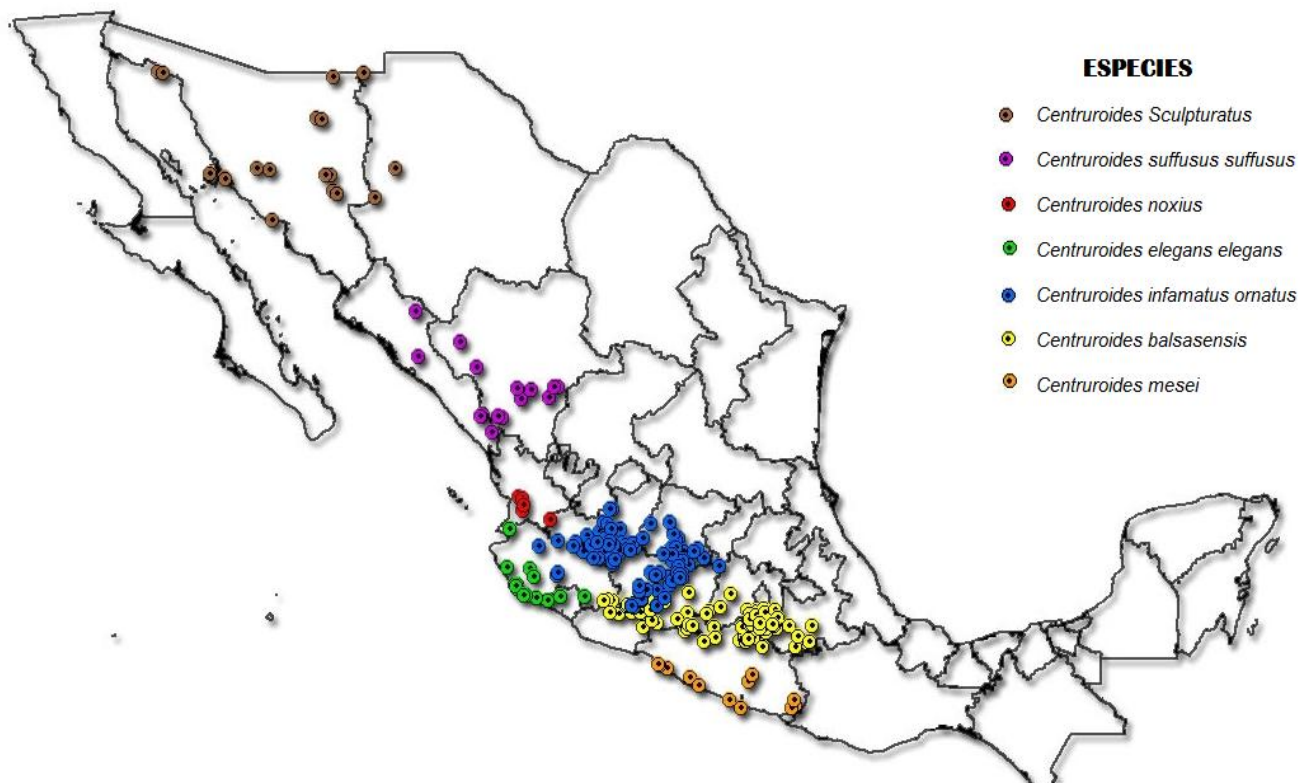


Figura 1a. Mapa de distribución de siete especies del género *Centruroides* en México (Figura proporcionada por Oscar Francke).

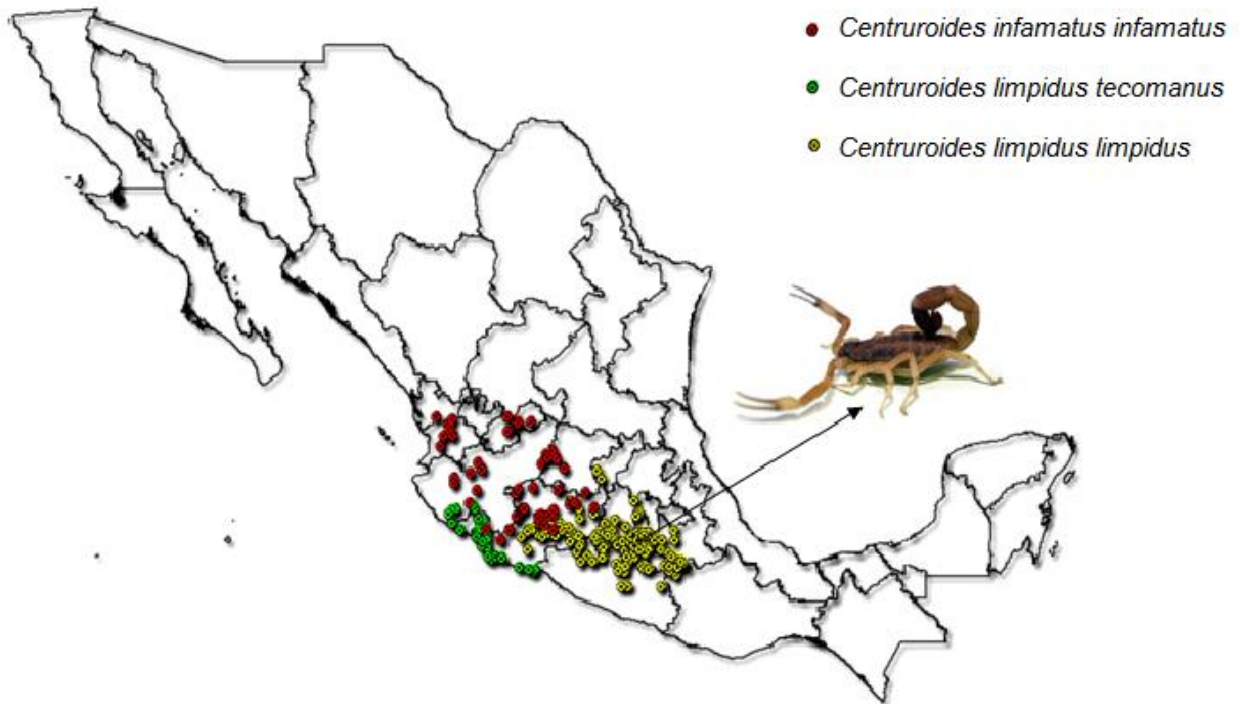


Figura 1b. Mapa de distribución de tres especies del género *Centruroides* en México (Figura proporcionada por Oscar Francke).

En México una gran parte de los casos de envenenamiento por piquete de alacrán, se atribuyen a la especie de *C. limpidus*.

Los síntomas que se desencadenan después del piquete de alacrán pueden variar con base en el alacrán (especie, número de picaduras y cantidad de veneno inyectado) por las características propias de (edad, peso, estado de salud, el tiempo que transcurre desde el piquete hasta que es tratado), así como del tratamiento utilizado (Ismail, 1994; Meier y White, 1995). Los signos y síntomas inmediatos que se observan en la persona que ha sido picada por un alacrán de los considerados venenosos para el humano son: dolor intenso en la zona de la picadura, parestesias, prurito nasal y sensación de cuerpo extraño en la faringe. Posteriormente, se puede presentar: salivación excesiva, secreción

nasal, taquipnea, disnea, náusea, vómito, priapismo y midriasis. En envenenamientos severos puede haber taquicardia, edema pulmonar, convulsiones, ataxia, bradicardia, shock circulatorio, estado de coma e incluso la muerte (Possani, 2005).

El veneno de alacrán es una mezcla compleja de moléculas sin embargo, no todas tienen importancia para efecto del envenenamiento, entre ellas, aminoácidos libres y sales orgánicas. Por otra parte, se ha demostrado que las responsables de los efectos tóxicos en humanos son moléculas de bajo peso molecular (6-7kDa), llamadas toxinas (Revelo *et al.*, 1996). El análisis de secuencia de los péptidos purificados a partir de venenos de alacrán muestran, que con base en su longitud, existen al menos dos grupos: uno de ellos corresponde a péptidos de cadena larga (58-76 aminoácidos) que actúan sobre el canal de sodio dependiente de voltaje. En el otro grupo, se encuentran péptidos de cadena corta (20-43 aminoácidos) y que son específicos para canales de potasio en membranas excitables (Rodríguez de la Vega y Possani, 2006). Dado que las toxinas no atraviesan la barrera hematoencefálica, los principales efectos causados por el veneno de alacrán ocurren a nivel del sistema nervioso periférico (Revelo *et al.*, 1996).

### **2.3 Canales iónicos dependientes de voltaje como blanco de las toxinas.**

Dado que algunos procesos biológicos como la contracción muscular, la secreción de hormonas, el procesamiento de la información en el cerebro así como la salida de la transmisión nerviosa hacia órganos y tejidos periféricos, suceden por efecto de los impulsos nerviosos, dependientes de la acción coordinada de canales iónicos selectivos en la membrana neuronal. El hecho de que principal blanco de las toxinas de alacrán sean los canales iónicos de sodio, de potasio y de calcio, explica la agresividad de los síntomas y sus consecuencias fisiológicas.

Por su parte, los canales iónicos son una superfamilia de más de 140 proteínas estructuralmente relacionadas, las cuales son blancos moleculares de una extensa gama de toxinas biológicas (Siegel *et al.*, 1999). Estos funcionan permitiendo la entrada de iones específicos, y que se activan en respuesta a diferentes estímulos, tales como el cambio de voltaje en la membrana donde están embebidos.

### 2.3.1 Canal de sodio

El canal de sodio dependiente de voltaje se compone de proteínas transmembranales que participan en la despolarización rápida de células excitables para generar el potencial de acción en nervios, músculo y células endócrinas. Este canal es el responsable de la fase ascendente del potencial de acción. Durante el reposo, los canales se encuentran cerrados a valores de potencial de membrana y requieren un estímulo despolarizante para pasar al estado abierto.

La estructura del canal de sodio en mamíferos se compone, de un sensor de voltaje y elementos que forman el poro. El complejo proteico que compone la unidad formadora de poro es la subunidad  $\alpha$  de 220-260 kDa, con cuatro dominios homólogos. Después de que la subunidad alfa recibe las señales de voltaje, se activa la formación del poro en un arreglo de cuatro de sus dominios para permitir la entrada de iones de sodio. El canal puede tener una o dos subunidades  $\beta$  auxiliares de 33-36 kDa, que le confieren estabilidad (Catterall *et al.*, 2006) (Figura 2).

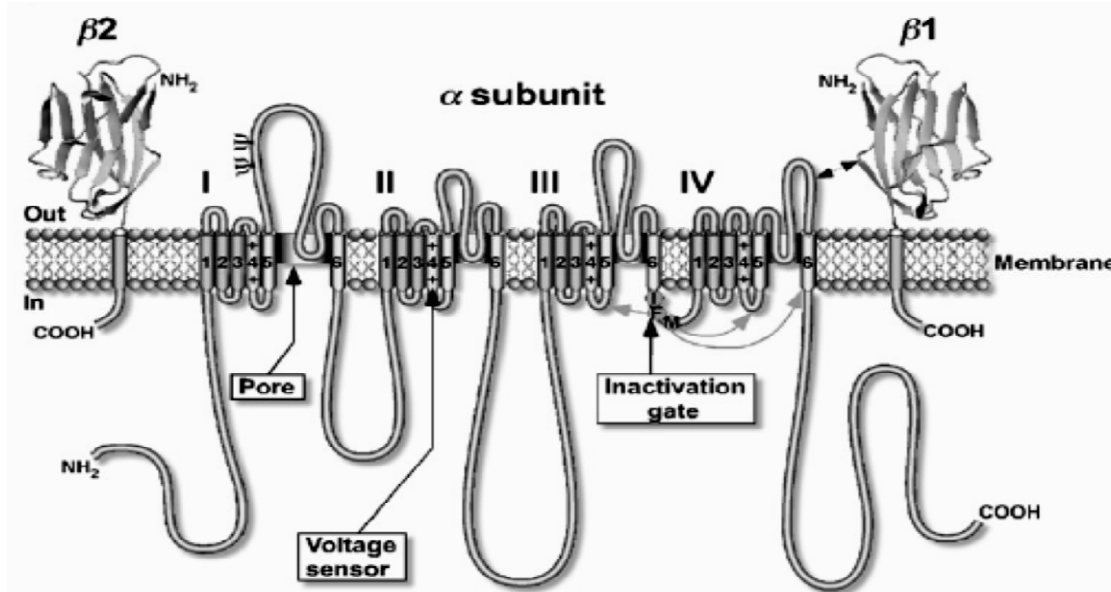


Figura 2. Estructura del canal de sodio voltaje dependiente. Tomada de Graham M. Nicholson (2006).

Los estudios moleculares y electrofisiológicos proponen diferentes sitios donde las toxinas de alacrán pueden estar interactuando con el canal, modulando así su actividad. Uno de estos sitios, es el segmento S3-S4 del dominio II, donde actúa la toxina  $\beta$ -NaScTX (Figura 3); y el otro sobre el segmento S3-S4 del dominio IV, donde actúa la toxina  $\alpha$ -NaScTx (Figura 3) (Harvey *et al.*, 1992; Rodríguez de la Vega y Possani, 2006).

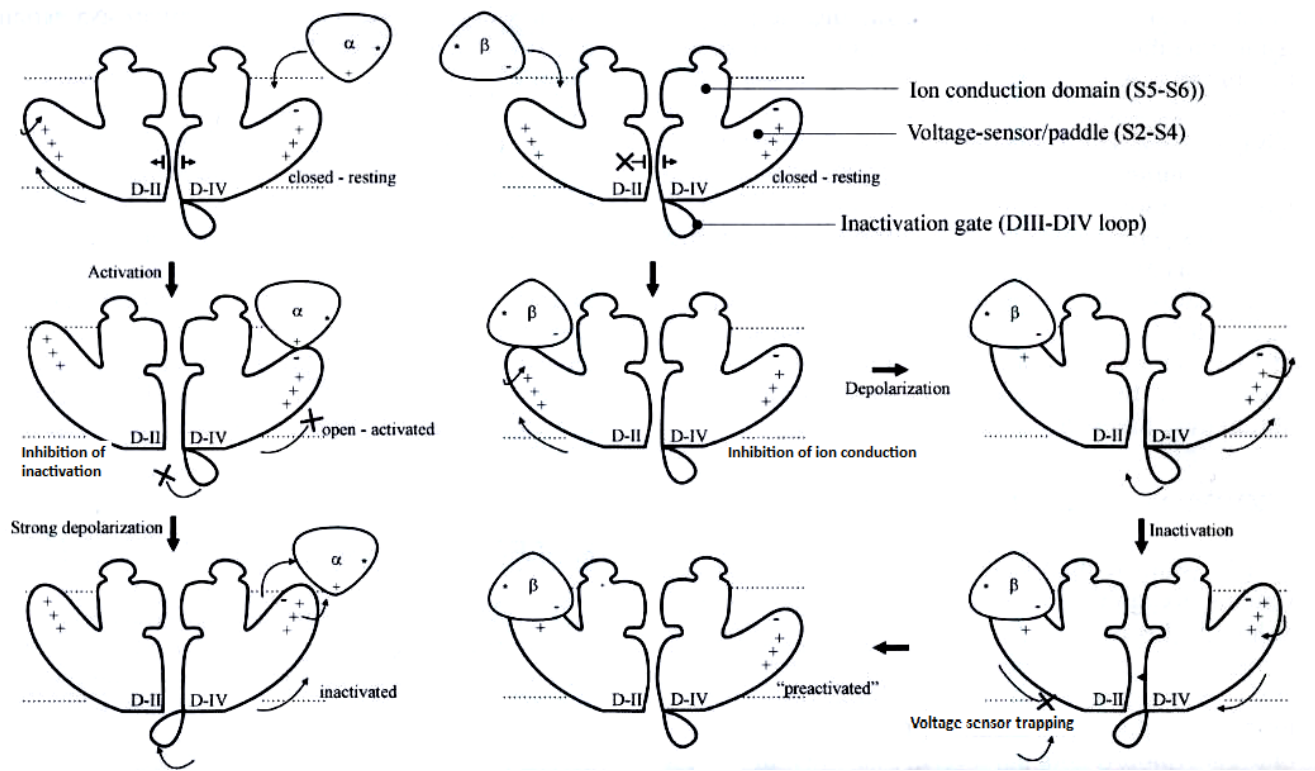


Figura 3. Sitios de unión propuestos, para las  $\beta$ -NaScTX y las  $\alpha$ -NaScTx en el canal de sodio. Tomada de: Scorpion venom peptides (Rodríguez de la Vega y Possani, 2006).

### 2.3.2 Canal de potasio voltaje- dependiente

El canal de potasio voltaje-dependiente es otro canal iónico blanco de algunas toxinas del alacrán; el cual se activa por la despolarización de la membrana celular, en mamíferos. Posteriormente, el movimiento de los iones de potasio, repolariza nuevamente la membrana y termina el potencial de acción (Miller, 2000).

Este canal se compone de cuatro subunidades transmembranales, cada una de las cuales es un dominio análogo de las principales subunidades de los canales de sodio y calcio. Existe una gran diversidad de estos canales, gracias a la expresión de diferentes combinaciones de las subunidades del canal (Siegel *et al.*, 1999; Graham, 2006); por lo cual, con base en la homología de su secuencia, se han clasificado en 12 subfamilias (Gutman *et al.*, 2005).

El bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje, produce un incremento en la duración del potencial de acción o en la frecuencia de descarga, y como consecuencia, aumenta la duración de la despolarización en la terminal nerviosa. Se han identificado tres formas en las que las toxinas de alacrán actúan sobre canales de potasio voltaje dependiente (Figura 4) (Rodríguez de la vega *et al.*, 2003).

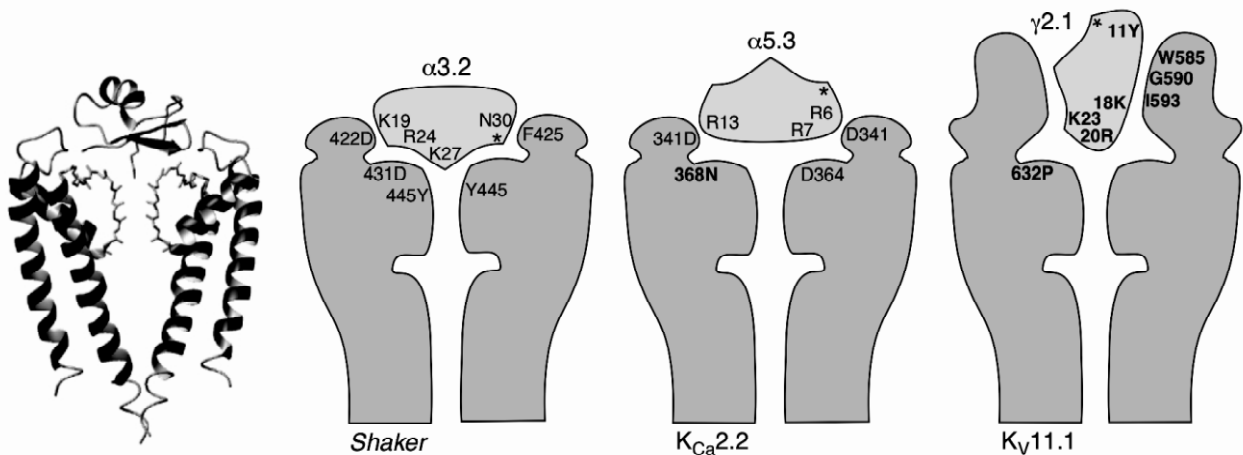


Figura 4. Formas en las que pueden actuar las toxinas de alacrán sobre algunos canales de potasio voltaje dependientes (Tomada de Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003).



La primer toxina caracterizada con acción específica sobre canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje fue la noxiustoxina (NTX), obtenida a partir del veneno del alacrán *C. noxius*. La toxina es un polipéptido de 39 residuos de aminoácidos con tres puentes disulfuros (Possani *et al.*, 1982; Gurrola y Possani, 1995). En la última década se han descrito diferentes toxinas que actúan como ligandos específicos sobre distintos tipo de canales de potasio. En este sentido, las toxinas provenientes del veneno de alacrán han sido importantes herramientas en la identificación y caracterización de estos canales (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2005). Así mismo el estudio de la acción que tienen las toxinas del veneno de alacrán sobre la transmisión nerviosa, específicamente sobre los canales iónicos, ha tenido un papel importante en el entendimiento de los efectos del veneno sobre el humano.

### **2.3 Envenenamientos causados por serpientes.**

Hay una gran diversidad de especies de serpientes distribuidas alrededor del mundo, aunque no todas son de importancia médica. Aquéllas cuyo veneno es tóxico para el humano, se agrupan en cuatro familias: *Elapidae*, *Viperidae*, *Atractaspididae* y *Colubridae* (Mc Nally *et al.*, 2008). Estas se distribuyen principalmente en zonas de clima tropical alrededor del mundo. Sin embargo, se les ha encontrado, aunque con menor frecuencia, en regiones subárticas y a 3000 metros de altitud.

Los venenos de serpientes, en general, son mezclas complejas de moléculas, que le permite a las serpiente defenderse (produciendo dolor), capturar a su presa (inmovilización o muerte) y alimentarse (digestión). El sistema de inyección de veneno en las distintas familias de serpientes tiene características especiales para cada una de ellas. En el caso de los vipéridos el veneno se encuentra almacenado en glándulas que se comunican por un canal con los colmillos, los cuales funcionan como agujas hipodérmicas. Los colmillos pueden girar y replegarse para permanecer ocultos cuando la boca de la serpiente se encuentra cerrada (Meier y White, 1995).

### **2.4.1 Vipéridos**

Los vipéridos pertenecen a la gran familia de serpientes venenosas *Viperidae*, que incluye a las víboras del viejo mundo y a los crotalinos del nuevo mundo. Sus venenos, en general, contienen moléculas de mediano y alto peso molecular (de 20 a 60 kDa) las cuales, pueden ocasionar edema, coagulopatías y necrosis, poniendo en riesgo la vida del accidentado (Saravia *et al.*, 2001; Panfolli *et al.*, 2006).

Dentro de las afectaciones que comúnmente se observan en los pacientes que han sido mordidos por serpientes de la familia *viperidae*, son las relacionadas con el sistema de la coagulación sanguínea. La hemóstasis está finamente regulada por las señales y actividad de las células en la circulación sanguínea, y por las proteínas del plasma. Las toxinas de los venenos de vipéridos pueden actuar sobre una gran variedad de moléculas que participan en la cascada de coagulación, incluyendo: el fibrinógeno, la protrombina, el factor V, el factor IX, el factor X y la trombina. Por lo cual, el desbalance o desorganización de este sistema provocado por el veneno produce graves efectos en la presa o en el accidentado, comprometiendo sus funciones fisiológicas (Braud *et al.*, 2000).

Otro blanco de estas toxinas es sobre la actividad plaquetaria ya sea promoviendo o evitando su agregación (Xiao-Yan Du *et al.*, 2006).

Los envenenamientos por vipéridos, también se caracterizan por un daño local severo en el sitio de la mordedura el cual, puede desarrollarse rápidamente después del accidente. Otros síntomas que se presentan después de la mordedura son dolor intenso en el sitio del envenenamiento, que con el tiempo se extiende en todas las direcciones, inflamación y edema, puede haber cambios en la frecuencia del pulso y la presión sanguínea, náuseas, vomito y necrosis local (Weinstein *et al.*, 2009).

#### **2.4.1.1 *Crotalus atrox.***

Dentro de la gran familia de los vipéridos encontramos al género *Crotalus* que comprende a 36 especies, localizadas sólo en América, desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina. El nombre de género deriva del griego *crotalon*, que significa

"castañuela", haciendo referencia a la estructura que simula un cascabel en la punta de la cola, y que distingue a este grupo (Figura 5) (Klauber, 1997).



Figura 5. Fotografía de un ejemplar de *C. atrox*.

Una gran parte de los envenenamientos reportados por mordeduras de serpiente en el sur de los Estados Unidos son ocasionados por *Crotalus atrox*, conocida también como víbora cascabel o víbora serrana. *C. atrox* es una de las serpientes más grande de su género; donde los adultos miden alrededor de 120 cm de longitud y el peso corporal de algunas de ellas puede llegar a ser hasta de 6.7 kg (Klauber, 1997).

El área geográfica donde se distribuye, es amplia (Figura 6), pudiéndose encontrar desde el sureste de los Estados Unidos en Arkansas, Arizona, California, Nuevo México, Nevada, Oklahoma y Texas. En el norte de México en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Querétaro y Oaxaca; también se encuentra en el norte de Baja California y en las islas Tiburón, Dátil, San Pedro Mártir y Santa Cruz en el Golfo de California. (RedTox.org)

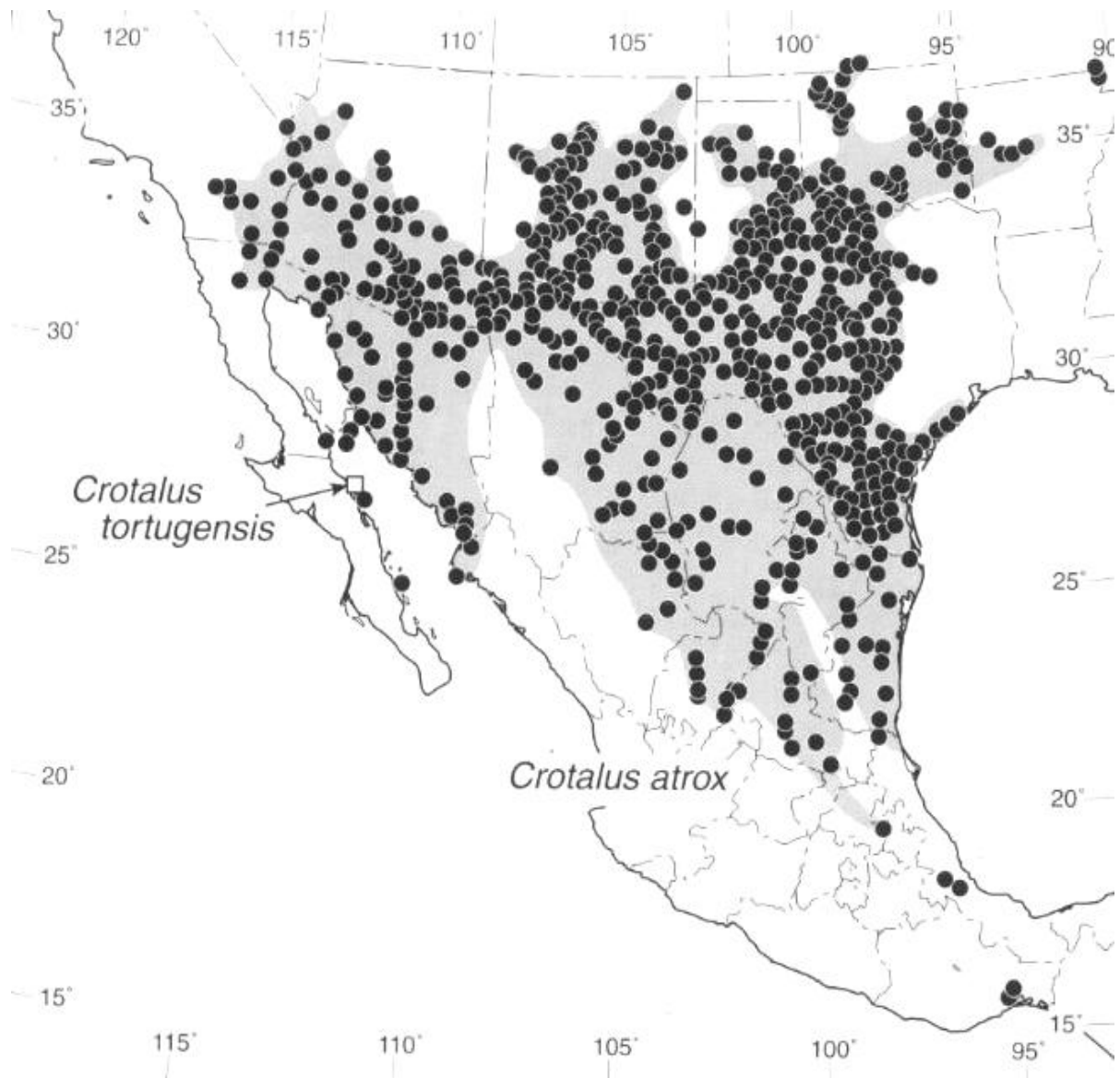


Figura 6. Mapa de distribución de la especie *C. atrox* (Tomada de Campbell y Lamar, 2004)

En un estudio realizado en 393 ejemplares de la especie *C. atrox*, se documentó que la cantidad de veneno que esta serpiente puede administrar va desde 220 hasta 645 mg, esto la convierte en una verdadera emergencia médica, dado que se estima que la dosis letal para un humano adulto promedio es tan sólo de 100 mg (Klauber, 1997).

El envenenamiento es causado por componentes del veneno que actúan a diferentes niveles. Dentro de los mejor caracterizados, y a los cuales se les atribuye el envenenamiento, encontramos miotoxinas de bajo peso molecular, fosfolipasas A2, serinoproteasas y metaloproteinasas entre otras (Gutiérrez y Rucavado, 2000).

En un estudio proteómico del veneno de *C. atrox* se encontró, que el 69.5 % del total de proteínas corresponden a metaloproteinasas y serinoproteasas; el 25.8 % está constituido por desintegrinas de tamaño mediano, PLA2 y L-aminooxidasa; y en el resto de las proteínas se encontraron péptidos vasoactivos y lectina del tipo C. Esta composición proteica podría explicar los efectos citotóxico, hemotóxico, miotóxico, y hemorrágico del veneno (Calvete *et al.*, 2009).

#### **2.4.1.2 Metaloproteinasas.**

Estas moléculas comprenden una serie de enzimas, dependientes de zinc de variable peso molecular (22-100 kDa), y con capacidad para producir graves efectos en el sitio de la mordedura, tales como hemorragia, mionecrosis, dermonecrosis, edema, inhibición de la agregación plaquetaria, liberación del factor TNF- $\alpha$  y degradación de la matriz extracelular (Meier y White, 1995).

Todas las metaloproteinasas son sintetizadas como zimógenos, es decir, necesitan escindirse para adquirir una estructura activa. La región de control la constituye un motivo repetido de cisteínas, el cual permite inhibir la actividad enzimática. El efecto de inducción de la hemorrágica por parte de las metaloproteinasas se ha asociado a su actividad proteolítica, en la cual el zinc juega un papel importante; de tal manera que si el zinc es eliminado desaparece la actividad proteolítica y hemorrágica (Gutiérrez y Rucavado, 2000).

Las metaloproteinasas de los venenos se han clasificado, con base en la estructura de sus dominios, en cuatro grupos principales. Las P-I que tienen sólo el dominio de metaloproteinasa, las P-II con un dominio de metaloproteinasa y un dominio de desintegrina, las P-III que cuentan con los dominios de metaloproteinasa, desintegrina y además un dominio rico en cisteínas y, finalmente, las P-IV que contienen los mismos dominios de la P-III y un polipéptido de lectina unido por un puente disulfuro a la cadena del dominio de metaloproteinasa. El dominio de desintegrina que contienen algunas metaloproteinasas, como las del grupo II, es el responsable de la agregación plaquetaria gracias a la unión con la glicoproteína IIb-IIa del receptor de fibrinógeno en la membrana plasmática de las plaquetas (Gutiérrez *et al.*, 2005). De manera general, se ha observado en experimentos *in vivo*, que las del grupo P-III son las que presentan mayor potencia hemorrágica, mientras que las del grupo P-I no presentan actividad hemorrágica (Bjarnason y Fox, 1994).

Algunas de estas moléculas han sido bien caracterizadas y un ejemplo de ellas es la catrocolastatina, con peso molecular de 50 kDa, aislada de veneno de *C. atrox*. Esta metaloproteinasa fue caracterizada como un inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Shimokawa *et al.*, 1997).

#### **2.4.1.3 Fosfolipasa A2.**

Las fosfolipasas A2 (PLA2) son moléculas que de manera habitual se encuentran presentes en los venenos de una gran variedad de serpientes, con alta actividad tóxica. Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de enzimas que hidrolizan el enlace sn-2 en los grupos acilos de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. El tamaño molecular de las PLA2 de los venenos de serpientes, fluctúa entre 120 y 135 aminoácidos, con siete puentes disulfuro. Su conformación es de tres  $\alpha$ -hélices que contienen residuos catalíticos, una asa de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y una estructura  $\beta$  conocida como ala- $\beta$  (Kini, 2003; Pungerc' *et al.*, 2007). Las fosfolipasas de venenos de serpientes pueden ser monoméricas, homodiméricas o heterodiméricas. Son altamente tóxicas para los nervios, músculo, plaquetas, leucocitos e incluso eritrocitos (Braud *et al.*, 2000).

No existe un mecanismo de acción bien establecido de cómo actúan las PLA2 sobre las plaquetas, sin embargo, se ha visto que inhiben o inducen la agregación plaquetaria (Xiao-Yan Du *et al.*, 2006). Algunas de ellas no tienen efecto tóxico cuando están aisladas, es decir, requieren formar complejos con otras moléculas para tal efecto. En algunos casos, los componentes de los complejos se mantienen unidos por un enlace covalente, como en el caso de la  $\beta$ -bungarotoxin, mientras que en otros la interacciones entre los componentes es no-covalente como ocurre con la crotoxina, la toxina de Mojave, la taipoxina, la textilotoxina y la taicotoxina (Kini, 2003).

Las PLA2 están también presentes en mamíferos, sin embargo, ahí su papel es diferente. Son importantes en la fertilización, la proliferación celular y la contracción del músculo liso, entre otras funciones. Participan además en la transducción de señales para la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Las enzimas de mamíferos no son tóxicas, contrario a lo que sucede con buena parte de las PLA2 de los venenos de serpientes (Burke y Dennise, 2009).

## **2.5 Antivenenos.**

El tratamiento de primera elección en el caso de los envenenamientos causados por animales ponzoñosos, es el uso de los antivenenos. Esta terapia se basa en la administración de anticuerpos neutralizantes completos o fragmentos de ellos contra el veneno de interés, evitando así, la acción enzimática o neurotóxica de los venenos (Chippaux, 1997).

Los anticuerpos son las moléculas del sistema inmune generadas a partir de la respuesta inmune humoral, cuando ésta es estimulada por la presencia de un inmunógeno. Los anticuerpos no sólo constituyen un mecanismo de protección contra las infecciones causadas por agentes infecciosos como virus o bacterias, sino también, contra la acción de toxinas secretadas por bacterias o las que forman parte de los venenos de animales ponzoñosos.

Los anticuerpos están constituidos por dos cadenas polipeptídicas pesadas y por dos cadenas ligeras, las cuales son idénticas entre sí. Cada una de ellas posee una

región variable y una región constante, por lo que cada molécula de anticuerpo tiene dos regiones variables o de unión al antígeno (Figura 7) (Janeway, 2001).

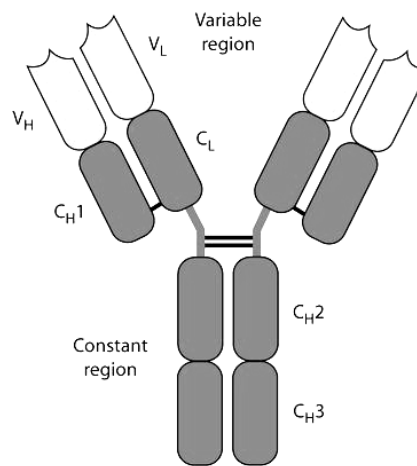


Figura 7. Estructura general de las inmunoglobulinas tipo IgG.

La obtención de altos títulos de anticuerpos neutralizantes específicos, se obtienen a partir de la hiperinmunización de animales. Es decir, se induce la respuesta humoral del animal de tal manera que genere un gran número de anticuerpos, contra el antígeno de interés, estableciendo así un estado de inmunidad mayor a los niveles normales.

Los protocolos de hiperinmunización son diseñados conforme al interés particular que se tiene, sobre los anticuerpos generados. Por ejemplo, la obtención de grandes volúmenes de suero que contengan anticuerpos neutralizantes, a nivel de producción de antivenenos o, en otros casos, la producción de anticuerpos específicos para pruebas de diagnóstico o con fines de investigación. Existen diversos factores que se consideran en este diseño tales como, el modelo animal que será inmunizado, las propiedades fisicoquímicas del inmunógeno, la dosis, el adyuvante, el número de retos, el tiempo que transcurre entre la inoculación y la medición de la respuesta, así como el método de detección, entre otros (Schunk y Macallum, 2005).

Actualmente en el mundo se producen tres tipos de antivenenos (Chippaux, 1997). El primer tipo refiere a los sueros hiperinmunes (principalmente de caballo) que no sólo poseen los anticuerpos específicos contra el veneno sino también una gran cantidad de proteínas que son componentes habituales del suero, pero innecesarias para la actividad



neutralizante. La purificación de inmunoglobulinas del suero completo, por medio de precipitación con sales, permite eliminar aquellas proteínas sin actividad neutralizante y con capacidad inmunogénica en el hospedero, como la albúmina; de esta manera se produce el segundo tipo de antivenenos. Sin embargo, debido a la presencia de la fracción cristalizante en las inmunoglobulinas aún se pueden observar algunas reacciones indeseables. El tercer tipo de antivenenos se obtiene a partir de la digestión enzimática de las inmunoglobulinas que da lugar a fragmentos  $F(ab')_2$  de muy baja inmunogenicidad (Figura 8); los cuales conservan su capacidad para neutralizar el efecto tóxico del veneno. Este último tipo constituyen los llamados faboterápicos y son estos los que actualmente se utilizan comercialmente en México y otras partes del mundo.

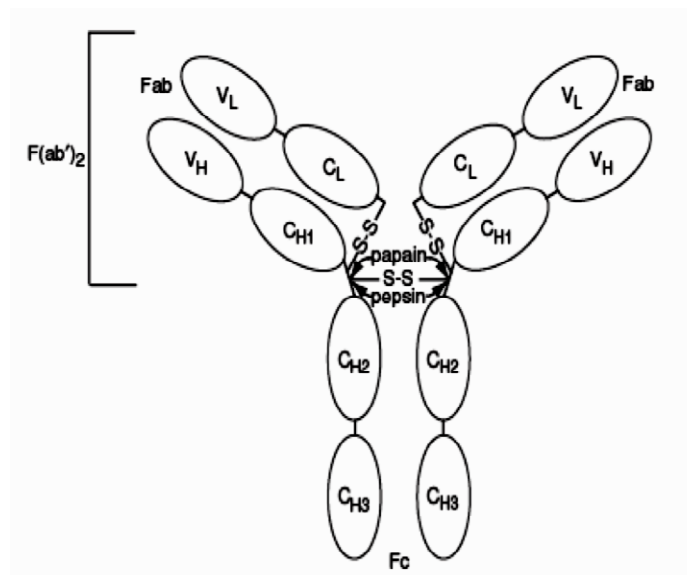


Figura 8. Digestión enzimática de una inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas son utilizadas como antivenenos, ya sea en su forma completas o como fragmentos, tienen características farmacocinéticas y farmacodinámicas diferentes de acuerdo en su tamaño, a la fuente animal de la que proceden, su valencia, la ruta de administración y su blanco específico (Gutiérrez *et. al.*, 2003). Estas características son de gran importancia, si se tiene en cuenta que gran parte su eficacia clínica depende de que puedan alcanzar rápidamente su blanco y ejercer la acción neutralizante.

Algunas diferencias farmacocinéticas que se han observado con base en el tamaño de las moléculas de los antivenenos son: su variación en la vida media ( $t^{1/2}$ ) IgGs > F(ab')<sub>2</sub> > Fab. El volumen de distribución es mayor en fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, aproximadamente 200-400 mL/kg, que en IgGs donde el volumen es de 90 mL/kg. En cuanto a la eliminación, las moléculas de IgG son depuradas principalmente por el complemento, mientras que la depuración de fragmentos Fab<sub>2</sub> se da a través del sistema retículo endotelial, y para los fragmentos Fab, la principal vía de eliminación es la renal (Seifert y Boyer, 2001). Estos y otros parámetros farmacocinéticos que siguen las inmunoglobulinas o sus fragmentos, son afectados según la vía de administración que se utilice.

### **Antivenenos en México.**

En México el tratamiento recomendado en el caso de envenenamiento por mordeduras de vipéridos, es la administración del antiveneno polivalente Antivipmyn®. Este se genera a partir de la hiperinmunización de caballos, con una mezcla de los venenos de *C. durissus durissus*, *C. atrox*, *C. scutulatus* y *B. asper*. Este antiveneno tiene la capacidad para neutralizar al menos 780 DL<sub>50</sub> del veneno deshidratado de *Bothrops sp.* y 790 DL<sub>50</sub> de veneno deshidratado de *Crotalus sp.*

Por otra parte, para tratar el envenenamiento por piquete de alacrán, se utiliza el antiveneno polivalente Alacramyn® el cual, contiene fragmentos F(ab')<sub>2</sub> neutralizantes contra los venenos de las cuatro especies de alacrán de mayor importancia médica para México (*C. limpidus*, *C. noxius*, *C. suffusus suffusus* y *C. tecomanus*). Con capacidad para neutralizar 150 DL<sub>50</sub> o 1.8 mg de veneno.

Para ambos antivenenos (Alacramyn® y Antivipmyn®) así como para la mayoría de los biofármacos, de naturaleza proteica, la administración recomendada es por vías parenterales, ya que por otras vías como la oral pueden desnaturalizarse y por tanto perder su actividad terapéutica. De las vías parenterales la intravenosa (I.V.) es la más utilizada, dado que, a través de ella se tiene acceso directo a torrente sanguíneo y se observa el efecto terapéutico en tiempos más cortos con respecto a otras vías de

administración parenteral, como pueden ser, la intramuscular (I.M.) o la subcutánea (S.C.).

## **2.6 Vías de administración.**

La administración de fármacos para su absorción sistémica en el organismo puede ser por vía parenteral, enteral, inhalación, transdermal e intranasal. Cada una de esas tiene sus ventajas y desventajas; por lo cual, la vía de administración dependerá entonces, tanto de las propiedades farmacocinéticas de cada fármaco como del efecto que se busca. La vía de administración puede afectar la biodisponibilidad del fármaco afectando, además, la potencia y duración del efecto farmacológico (Velázquez, 2004).

En general, la administración intravenosa de un fármaco permite un efecto farmacológico rápido, debido a que el fármaco se distribuye desde el torrente sanguíneo a todos los órganos y tejidos en pocos minutos. Esta vía tiene algunas ventajas, respecto a otras vías de administración, tales como la de evitar la acción irritante en el tubo digestivo, subcutáneo o muscular, así como la rapidez del efecto terapéutico, entre otras. Sin embargo, la administración de fármacos por esta vía también presenta desventajas tales como la posibilidad de elevar excesivamente los niveles plasmáticos del fármaco y provocar reacciones adversas o tóxicas inmediatas, el riesgo de infección por contaminantes bacterianos, virales o sustancias pirógenas, así como desencadenar reacciones anafilácticas con mayor facilidad que otras.

Cuando la vía de administración es intramuscular, el fármaco se absorbe desde el sitio de la inyección al torrente sanguíneo. La entrada del fármaco hacia el torrente sanguíneo involucra el proceso de absorción en la cual la concentración del fármaco alcanza un pico de máxima concentración y disminuye de acuerdo con el tiempo de vida media de eliminación del mismo fármaco. La absorción del fármaco después de la administración intramuscular, puede ser rápida o lenta según sus propiedades fisicoquímicas, así como del grupo de músculos donde se inyectó debido principalmente a que las diferentes masas musculares tienen distinto flujo sanguíneo y se ha visto que los músculos con mayor irrigación sanguínea presentan una absorción más rápida (Shargel y Yu, 1993).

La tasa de absorción por vía subcutánea e intramuscular está limitada por un lado, por el área disponible para la absorción, y por el otro, por la solubilidad de las sustancias en el líquido intersticial. Las moléculas pequeñas difunden libremente, sin importar su grado de solubilidad en lípidos, a través del endotelio de los capilares sanguíneos. Las moléculas de mayor tamaño, como las proteínas, ingresan lentamente a la circulación sistémica por medio de los conductos linfáticos o por medio de moléculas acarreadoras (Velasco, 2000).

En el caso de los antivenenos, dada su naturaleza fisicoquímica y la necesidad de que el efecto terapéutico se ejerza en el menor tiempo posible, se recomienda la aplicación por vía parenteral, específicamente de manera intravenosa (Riviere *et al.*, 1996).

En hospitales y centros de salud, el antiveneno Alacramyn® es administrado por vía intravenosa. Sin embargo, en algunos casos, en comunidades aisladas y lejanas de un centro de salud, donde no se cuenta con personal capacitado para administrar el antiveneno por la vía intravenosa, se recurre a la administración del antiveneno por vía intramuscular, obteniéndose aparentemente resultados satisfactorios, aunque en tiempos ligeramente más prolongados con respecto a la administración intravenosa.

Existen antecedentes de que esta misma práctica se realiza en otros países de América Latina como Guatemala y Costa Rica, donde se reporta, que tras la administración intramuscular del antiveneno las personas se recuperaron del envenenamiento (Chaves *et al.*, 2003). No obstante, a la fecha no se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual el antiveneno aplicado por vía intramuscular puede neutralizar al veneno, debido a que existen pocas evidencias que describan su acción por esta vía.

Los trabajos relacionados con el tema son escasos y existen discrepancias en cuanto a la efectividad de los antivenenos por vía intramuscular. Ellis y colaboradores realizaron en 2005, un ensayo en pacientes que habían sido mordidos por la araña del género *Latrodectus sp.*, y que presentaban el cuadro clínico conocido como latrodectismo. Los pacientes se eligieron arbitrariamente para ser tratados con el antiveneno, por vía intramuscular o intravenosa. Un grupo de pacientes recibieron el antiveneno por vía I.V. y

a otro grupo se le administró por vía I.M. Posteriormente midieron la efectividad del antiveneno según la desaparición del dolor, dado que es el principal síntoma que se desencadena por la mordedura de esta araña. Después de analizar los resultados, concluyeron que no existía diferencia significativa en la efectividad del antiveneno cuando se administra por vía I.V. o I.M. (Ellis *et al.*, 2005).

Por otro lado, Isbister y colaboradores publicaron en 2007 otro estudio sobre un antiveneno contra *Lactrodectus sp.*, administrado por vía I.V. o I.M. en pacientes con lactrodectismo. Ellos concluyeron que el antiveneno ejerce mejor su acción por vía intravenosa que por vía intramuscular, con base en el nivel del antiveneno en sangre, empleando la técnica de ELISA; en este estudio sólo se evidenció niveles de antiveneno en sangre cuando la administración fue administrado por vía I.V. Mientras tanto, cuando el antiveneno se administró por I.M. este fue indetectable en sangre aún varias horas después (Isbister *et al.*, 2007). Recientemente, esto también se observó en un estudio farmacocinético realizado por nuestro grupo con voluntarios sanos, en el cual se administró el antiveneno por vía intramuscular y se midió la concentración en sangre por medio de ELISA. La cantidad de antiveneno detectada en sangre fue mínima, incluso hasta varias horas después de la administración (Vázquez *et al.*, 2010 in press).

En un estudio comparativo en conejos se administraron vía intravenosa e intramuscular dos antivenenos, uno de IgG completa y el otro conteniendo fragmentos Fab, con la finalidad de determinar su protección contra la actividad miotóxica, desfibrinante y hemorrágica provocada por el veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Lo que se observó fue que al administrar por vía intravenosa ambos antivenenos protegen al animal de la actividad tóxica del veneno, pero cuando se administran vía intramuscular existe protección contra la actividad miotóxica y desfibrinante, sólo si se administra muy cerca del sitio de aplicación del veneno (Chaves *et al.*, 2003).

Estos antecedentes sugieren que el antiveneno administrado por vía intramuscular tiene cierto grado de neutralización sobre las toxinas presentes en los venenos, aunque mediante una forma de acción desconocida. Esto hace necesario la realización de estudios sistematizados que determinen el efecto terapéutico de los antivenenos por vías parenterales diferentes a la intravenosa.

### **3 JUSTIFICACIÓN.**

La eficacia de los faboterápicos para neutralizar a las moléculas tóxicas de los venenos contra los cuáles fueron desarrollados, está ampliamente demostrada cuando se administran por vía intravenosa. Sin embargo, la capacidad neutralizante de éstos cuando se utilizan otras vías parenterales tales como la intramuscular (I.M.), subcutánea (S.C.), o intraperitoneal (I.P.) ha sido pobremente estudiada, aún cuando se sabe que en comunidades alejadas de los hospitales o centros de salud se recurre a la vía I.M. para su aplicación, debido a la falta de personas capacitadas para la administración de fármacos por la vía intravenosa. Con base en ello, y dada la emergencia médica que representan estos accidentes, es necesario realizar estudios sistematizados que evidencien la capacidad neutralizante de los antivenenos utilizando vías de administración parenterales, diferentes a la intravenosa.

## **4 HIPÓTESIS.**

La capacidad neutralizante del antiveneno se modifica cuando es administrado por vías parenterales diferentes a la intravenosa, tales como la subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

## **5 OBJETIVO GENERAL.**

Determinar la influencia que tiene la vía de administración en la capacidad neutralizante de los antivenenos contra los venenos *Centruroides limpidus* y *Crotalus atrox*.

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.**

- ▶ Determinar la  $DL_{50}$  de los venenos de *C. limpidus* y *C. atrox* por vía intravenosa y subcutánea.
- ▶ Determinar la  $DE_{50}$  del Alacramyn® y Antivipmyn® en ratones, preincubando veneno-antiveneno.
- ▶ Determinar la  $DE_{50}$  de cada antiveneno en ensayos de “rescate” en ratones por las vías I.V., I.P., I.M. y S.C.

## **6 MATERIALES Y EQUIPOS.**

### **6.1 Venenos.**

- a. Veneno de *C. limpidus*: se utilizó veneno fresco que se obtuvo a partir de la ordeña, por estimulación eléctrica de 110 alacranes de la especie *C. limpidus* procedentes del estado de Guerrero.
- b. Veneno de *C. atrox*: Liofilizado proveniente de “Natural Toxins” (Kingsville, Texas), y almacenado a - 20 °C con fecha del 01-09-04.

### **6.2 Antivenenos.**

- a. Alacramyn® liofilizado. Lote: B-8F-03. Caducidad: Junio de 2012.
  - b. Antivipmyn® liofilizado. Lote: 8-E-16. Caducidad: Mayo de 2012.
- Ambos, donados por el instituto Bioclon S.A. de C.V.

### **6.3 Modelo animal.**

Ratones de la cepa CD1, de ambos sexos y con peso de 18 a 20 g adquiridos en Harlan México S.A. de C.V.

### **6.4 Material de inoculación.**

- a. Jeringas de 3 mL con aguja de 21GX32 mm
- b. Jeringas de 1 mL con aguja de 27GX13 mm

### **6.5 Equipos:**

- a. Balanza analítica: Marca OHAUS; Modelo Adventurer ARO640.
- b. Liofilizadora: Marca LABCONCO; Modelo 05942197E.
- c. Espectrofotómetro (UV-Vis): Marca Eppendorf; Modelo 22331.
- d. Incubadora a 37 °C: Marca Quincy; Modelo 10-140.
- e. Centrifuga: Marca Eppendorf; Modelo 5415 C.



## **7 METODOLOGÍA.**

### **7.1 Recuperación del veneno fresco de *C. limpidus*.**

- 1) Se realizó la ordeña de 110 alacranes de la especie *C. limpidus* por estimulación eléctrica, con el protocolo previamente reportado (Miranda *et al.*, 1970), en una caja petri de cristal.
- 2) Se recuperó el veneno fresco, haciendo cuatro extracciones con 0.5 mL de agua bidestilada. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 13000 revoluciones por minuto. Se recuperó el sobrenadante y se le determinó la absorbancia a 280 nm haciendo una dilución 1:20. El sobrenadante se liofilizó y se almacenó a - 20 °C hasta su uso.

### **7.2 Preparación del stock de los venenos de *C. limpidus* y de *C. atrox*.**

- 1) Para ambos venenos, se pesaron 5 mg del liofilizado en balanza analítica y se reconstituyeron en 5 mL de solución salina (150 mM). Se les determinó, además, su concentración por absorbancia a 280 nm. Se hicieron alícuotas de 500 mL; éstas se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La preparación de ambos stocks se repitió de la misma forma cada vez que fue necesario.

### **7.3 Determinación de la DL<sub>50</sub> intravenosa de *C. limpidus* y *C. atrox*.**

- 1) Se inocularon grupos de seis ratones por vía intravenosa, en la vena caudal de la cola, con diferentes cantidades del veneno a ensayar, partiendo del stock preparado anteriormente (punto 7.1); éstas se ajustaron con solución salina para inocular un volumen de 500 mL por ratón.
- 2) En este ensayo se inoculó también un ratón por vía intravenosa, sólo con 500 mL de solución salina y éste fue considerado como control. La inoculación de todos los ratones se realizó con aguja de 21G X 32 mm. Los diferentes grupos se aislaron en jaulas independientes con agua y comida. La lectura de mortalidad se tomó 24 h posteriores a la inyección, en el caso del veneno de *C. limpidus*, y a las 48 h cuando el veneno de prueba fue de *C. atrox*.
- 3) Las DL<sub>50s</sub> así como las DE<sub>50s</sub> se determinaron a partir de las curvas dosis-respuesta, utilizando el software del programa Prism Grad Pad 4.0.; debido a que los datos

obtenidos en un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo, se utilizó la estadística no paramétrica. Esta es una rama de la estadística que estudia las pruebas y modelos estadísticos cuya distribución no se ajusta a los llamados criterios paramétricos. Su distribución no puede ser definida *a priori*, pues los datos observados son los que la determinan. La utilización de estos métodos se hace recomendable cuando no se puede asumir que los datos se ajusten a una distribución conocida.

El principal objetivo de las curvas dosis-respuesta es evaluar el nivel de estímulo necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población en estudio. El estímulo que causa una respuesta en el 50 % de estos individuos nos sirve para determinar, por ejemplo: la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), la dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ), la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) etc. Con la finalidad de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo, debe especificarse el periodo de tiempo durante el cual la población en estudio se expone al estímulo. Una curva de dosis-respuesta, es entonces, una representación gráfica de la correlación entre una serie de dosis consideradas como la variable independiente, y por tanto representadas en la abscisas (eje X), y el efecto observado considerado como la variable dependiente que se grafica en las ordenadas (eje Y) (Figura 9) (Velasco, 2000).

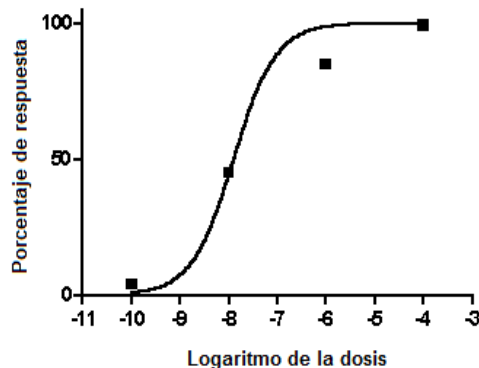


Figura 9. Ejemplo de curva dosis-respuesta.

#### **7.4 Determinación de la DL<sub>50</sub> subcutánea de *C. limpidus* y *C. atrox*.**

- 1) Se inyectaron grupos de seis ratones por vía subcutánea en el lomo, detrás del cuello, con diferentes cantidades del veneno a ensayar, partiendo del stock preparado anteriormente (punto 7.1), las distintas dosis se ajustaron con solución salina para inocular un volumen de 500 mcL por ratón.
- 2) En este ensayo se inoculó también un ratón por vía subcutánea en el lomo, detrás del cuello, sólo con 500 mcL de solución salina y éste fue considerado como control. La inoculación de todos los ratones se realizó con jeringa verde de 3 mL con aguja de 21G X 32 mm. Cada grupo inoculado se aisló en jaulas independientes con agua y comida. La lectura de mortalidad se tomó a las 24 h post inyección; en el caso del veneno de *C. limpidus*, y a las 48 h cuando el veneno de prueba fue de *C. atrox*.

#### **7.5 Determinación de la concentración proteica de los antivenenos Alacramyn® y Antivipmyn®.**

- 1) Se determinó la concentración proteica del lote de cada antiveneno utilizado en estos ensayos. Para lo cual, se reconstituyó un vial de Alacramyn® y uno de Antivipmyn® en 5 y 10 mL de solución salina 150 mM, respectivamente. De esta solución se realizó una dilución 1:20 y se midió la absorbancia a 280 nm; el resultado se dividió por el coeficiente de extinción de las inmunoglobulinas (1.4); determinándose así la concentración proteica por vial.

#### **7.6 Determinación de DE<sub>50</sub> de Alacramyn® preincubando veneno-antiveneno.**

- 1) Se prepararon diferentes mezclas de veneno-antiveneno, colocando en tubos independientes la cantidad equivalente a 3DL<sub>50I.V.</sub> del veneno (*C. limpidus*), y a su vez, diferentes cantidades del antiveneno (Alacramyn®) reconstituido en 5 ml de solución salina. Las mezclas fueron ajustadas con solución salina para inyectar un volumen de 500 mcL por ratón.
- 2) Las mezclas se incubaron por 30 min a 37 °C, previo a la inoculación en los ratones. Posteriormente se administraron vía I.V., en la vena de la cola, a grupos de seis ratones para cada mezcla. La inoculación se realizó con jeringa verde de 3 mL con aguja de 21G X 32 mm.

- 3) Con la finalidad de asegurar que la sobrevivencia observada correspondiera únicamente al efecto del antiveneno; se inoculó un ratón vía I.V. en la vena de la cola, con el equivalente a  $3DL_{50I.V.}$  del veneno de *C. limpidus*, ajustada a 500 mcL con solución salina, mismo que fue considerado como control.
- 4) Cada grupo inoculado se aisló en jaulas independientes con agua y comida. La lectura de sobrevivencia se tomó a las 24 h post-inyección.

### **7.7 Ensayo de rescate con Alacramyn® vía Intravenosa.**

- 1) Previo a los ensayos de rescate por distintas vías de administración, se retó un grupo control de cinco ratones con el equivalente a  $2DL_{50S.C.}$ , con la finalidad de garantizar que esta dosis de veneno mata al 100 % de la población y por tanto, la sobrevivencia en los ensayos de rescate corresponderá al efecto terapéutico del antiveneno.
- 2) Se retaron grupos de seis ratones por vía subcutánea en el lomo (detrás del cuello) con la cantidad equivalente a  $2DL_{50S.C.}$  del veneno (*C. limpidus*), ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mcL por ratón.
- 3) Transcurridos de 5-7 min se les administró a cada grupo distintas cantidades de antiveneno (Alacramyn®) reconstituido en 5 mL de solución salina, vía intravenosa en la vena de la cola.
- 4) Cada grupo inoculado se aisló en jaulas independientes con agua y comida y se tomó la lectura de sobrevivencia a las 24 h post-inyección.

### **7.8 Ensayo de rescate con Alacramyn® vía Intraperitoneal.**

- 1) Se administró por vía subcutánea en el lomo (detrás del cuello), a grupos de seis ratones, la cantidad equivalente a  $2DL_{50S.C.}$  del veneno (*C. limpidus*), ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mcL por ratón.
- 2) Transcurridos de 5-7 min se le administró a cada grupo, por vía intraperitoneal, diferentes cantidades de antiveneno (Alacramyn®) reconstituido en < 5 mL de solución salina. La administración intraperitoneal del antiveneno se realizó con jeringa de 1 mL y aguja 27G X 13 mm.
- 3) Como control, se inoculó un ratón por vía S.C. con la misma cantidad de veneno que el grupo de prueba y a éste no se le administró el antiveneno.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 24 h post-inyección.

### **7.9 Ensayo de rescate con Alacramyn® vía Intramuscular.**

- 1) Se administró por vía subcutánea a grupos de seis ratones, la cantidad equivalente a  $2DL_{50S.C.}$  del veneno (*C. limpidus*) ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mL por ratón.
- 2) Transcurridos de 5-7 min se les administró por vía intramuscular, en el muslo de la pata trasera, diferentes cantidades del antiveneno (Alacramyn®) reconstituido en < 5mL de solución salina 150 mM. La administración intramuscular del antiveneno se realizó con jeringa de 1 mL con aguja 27G X 13 mm.
- 3) Como control, se inoculó un ratón por vía S.C. con la misma cantidad de veneno que el grupo de prueba y a éste no se le administró el antiveneno.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 24 h post-inyección.

### **7.10 Ensayo de rescate con Alacramyn® vía subcutánea.**

- 1) Se administró por vía subcutánea a grupos de seis ratones la cantidad equivalente a  $2DL_{50S.C.}$  del veneno (*C. limpidus*) ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mL por ratón.
- 2) Transcurridos de 5-7 min se les administró por vía subcutánea en el lomo, a 1.5 cm del sitio de inoculación del veneno, diferentes cantidades de antiveneno (Alacramyn®) reconstituido en  $\leq 5$  mL de solución salina 150 mM.
- 3) Como control, se inoculó un ratón por vía S.C. con la misma cantidad de veneno que el grupo de prueba y a éste no se le administró el antiveneno.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 24 h post-inyección.

### **7.11 Determinación de la $DE_{50I.V.}$ de Antivipmyn®.**

- 1) Se prepararon diferentes mezclas de veneno-antiveneno, poniendo en tubos independientes la cantidad equivalente a  $3DL_{50I.V.}$  del veneno (*C. atrox*), y a su vez, diferentes cantidades de antiveneno (Antivipmyn®) reconstituido en 10 mL de solución salina. La mezcla se ajustó con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mL por ratón.
- 2) Las mezclas se incubaron por 30 min a 37 °C, previo a la inoculación. La administración de la mezcla se hizo por vía intravenosa, en la vena caudal de la cola,

a diferentes grupos de seis ratones. La inoculación de la mezcla se realizó con jeringa verde de 3 mL con aguja de 21G X 32 mm.

- 3) Como control se inoculó un ratón vía I.V. con el equivalente  $3DL_{50I.V.}$  del veneno en un volumen ajustado a 500 mcL con solución salina.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 48 h post-inyección.

#### **7.12 Ensayo de rescate con Antivipmyn® vía intravenosa.**

- 1) Se administró por vía subcutánea en el lomo (detrás del cuello), a grupos de seis ratones la cantidad equivalente a  $2DL_{50S.C.}$  o  $3DL_{50S.C.}$  del veneno (*C. atrox*), ajustada con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mcL por ratón.
- 2) Como control se inoculó un ratón con la misma dosis del veneno que a los grupos de prueba, y a éste no se le rescató.
- 3) Transcurridos de 8-10 min se les administró por vía intravenosa diferentes cantidades de antiveneno (Antivipmyn®), reconstituido en 10 mL de solución salina 150 mM, con aguja de 21G X 32 mm.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 48 h post-inyección y se realizó la curva dosis respuesta.

#### **7.13 Ensayo de rescate con Antivipmyn® vía intraperitoneal.**

- 1) Se administró por vía subcutánea en el lomo (detrás del cuello), a grupos de seis ratones la cantidad equivalente a  $2DL_{50S.C.}$  o  $3DL_{50S.C.}$  del veneno (*C. atrox*), ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mcL por ratón.
- 2) Al ratón control se le administró la misma dosis del veneno que a los grupos de prueba, pero a éste no se le administró el antiveneno.
- 3) Transcurridos de 8-10 min se les administró, por vía intraperitoneal, diferentes cantidades de antiveneno (Antivipmyn®) reconstituido en  $\leq 5$  mL. La administración intraperitoneal se realizó con aguja 27G X 13 mm.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 48 h post-inyección.

#### **7.14 Ensayo de rescate con Antivipmyn® vía subcutánea.**

- 1) Se administró por vía subcutánea a grupos de seis ratones, la cantidad equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> o 3DL<sub>50S.C.</sub> del veneno (*C. atrox*) ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mcL por ratón.
- 2) Al ratón control se le administró la misma dosis de veneno que a los grupos de prueba, pero no se le administró el antiveneno.
- 3) Transcurridos de 8-10 min se les administró por vía subcutánea en el lomo, a 1.5 cm del sitio de inyección del veneno, diferentes cantidades de antiveneno (Antivipmyn®) reconstituido en  $\leq 5$  mL. El antiveneno fue administrado con aguja de 21G X 32 mm.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 48 h post-inyección.

#### **7.15 Ensayo de rescate con Antivipmyn® vía intramuscular.**

- 1) Se administró por vía subcutánea (en el lomo detrás del cuello) a grupos de seis ratones la cantidad equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> o 3DL<sub>50S.C.</sub> del veneno (*C. atrox*), ajustadas con solución salina a un volumen final de inyección de 500 mcL por ratón.
- 2) Al ratón control se le administró la misma dosis de veneno que a los grupos de prueba, pero a éste no se le administró el antiveneno.
- 3) Transcurridos 8-10 min se les administró por vía intramuscular, en el muslo de la pata trasera, diferentes cantidades de antiveneno (Antivipmyn®) reconstituido en  $\leq 2.5$  mL. El antiveneno fue administrado con aguja de 21G X 32 mm.
- 4) Se tomó la lectura de sobrevivencia a las 48 h post-inyección.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Alacramyn® vs el veneno de *C. limpidus*

#### 8.1.1 **Determinación de la concentración del veneno de *C. limpidus*.**

Se recuperaron 2 mL de veneno fresco (ver 7.1 el de la metodología) y se midió la concentración de proteína, por  $A_{280}$  nm, el valor obtenido fue de 9.84 mg/mL. El veneno se liofilizó y almacenó a - 20 °C. La solución de trabajo se preparó pesando 5.0 mg del liofilizado y reconstituyendo en 5 mL de NaCl 150 mM; por lo cual, la concentración por peso fue de 1 mg/mL. Se cuantificó también la concentración proteica por  $A_{280}$  nm y el valor fue de 0.954 mg/mL. Se realizó la corrección de la concentración por peso, con el valor de la absorbancia.

#### 8.1.2 **Determinación de la concentración del veneno de *C. limpidus*.**

##### a) **DL<sub>50</sub> intravenosa del veneno de *C. limpidus*.**

Se inocularon cantidades crecientes del veneno en siete grupos de seis ratones (Tabla 1) y un ratón control con solución salina 150 mM. Después de 24 h de la inoculación, se tomó la lectura de mortalidad y se procesaron los datos.

Tabla 1. Determinación de la DL<sub>50i.v.</sub>

Grupo	Veneno (mcg/ratón)	No. De muertos	Mortalidad (%) 24 h
1	10.0	0/6	0
2	13.7	0/6	0
3	16.2	2/6	33.3
4	18.0	2/6	33.3
5	19.5	3/6	50
6	24.2	3/6	50
7	26.6	6/6	100

El valor de la DL<sub>50i.v.</sub> fue determinado a partir de la curva dosis respuesta, como se puede ver en la Figura A del apéndice 1. La DL<sub>50i.v.</sub> intravenosa fue de 21 mcg/ratón (I.C 95 % 17 a 25). Conviene resaltar que durante el ensayo se observó que los ratones mostraron síntomas de envenenamiento a los cinco minutos posteriores a la inoculación, tales como: salivación, prurito nasal, hiperactividad, dificultad para respirar y en algunos se observó parálisis de las patas traseras. Asimismo, el tiempo de la mortalidad osciló



entre los 10 a 40 minutos posteriores al envenenamiento. Por su parte, el ratón control no mostró síntomas de envenenamiento y se mantuvo vivo a las 24 h postinoculación.

**b) DL<sub>50</sub> subcutánea.**

Con la finalidad de realizar los ensayos de rescate envenenando a los ratones por vía subcutánea. Se determinó la DL<sub>50</sub> de *C. limpidus* por vía subcutánea inyectando en el lomo del ratón, detrás del cuello, distintas cantidades del veneno a siete grupos de seis ratones (Tabla 2). Además de un ratón control inoculado por la misma vía con 500 mcL de solución salina 150 mM. La lectura de la mortalidad se realizó a las 24 h posteriores a la inoculación del veneno.

Tabla 2. Determinación de la DL<sub>50S.C.</sub>

<b>Grupo</b>	<b>Veneno (mcg/ratón)</b>	<b>No. De muertos</b>	<b>Mortalidad (%) 24 h</b>
1	10.0	0/6	0
2	20.0	1/6	16.7
3	25.0	1/6	16.7
4	27.5	1/6	16.7
5	30.0	2/6	33.3
6	35.0	6/6	100
7	40.0	6/6	100

A semejanza de la obtención del DL<sub>50I.V.</sub>, se determinó la DL<sub>50S.C.</sub> a partir de la curva dosis respuesta (Figura B del apéndice 1) con los resultados de la Tabla 2; dando un valor de 31 mcg/ratón (I.C 95 % 29 a 33). Conviene resaltar que este valor fue 1.47 veces mayor que la DL<sub>50I.V.</sub>, lo cual sugiere una disminución en la letalidad al comparar dos diferentes vías de aplicación. Sin embargo, los síntomas de envenenamiento en estos animales fueron similares a los observados en el envenenamiento por vía intravenosa. La diferencia principal que se observó fue un aumento en el tiempo de muerte en comparación con la vía intravenosa; que en este caso fue de 15 a 60 minutos. Por su parte, el ratón control no mostró síntoma alguno y se mantuvo vivo a las 24 h.

### 8.1.3 Ensayo de neutralización preincubando veneno-antiveneno.

Este ensayo se realizó con la finalidad de encontrar la capacidad neutralizante del antiveneno *in vitro* preincubando veneno-antiveneno, es decir; sin las variantes propias del sistema biológico (el ratón) donde se probaría la neutralización *in vivo* en ensayos de rescate. Para este experimento se cuantificó la cantidad de proteína del Alacramyn®, por  $A_{280}$  nm la cual fue de 13.5 mg/vial. Posteriormente, las mezclas de veneno-antiveneno se realizaron como se describe en la metodología y se inocularon, por vía I.V.

#### a) $DE_{50}$ preincubando con $3DL_{50I.V.}$

Se inyectaron nueve grupos de seis ratones, con las distintas mezclas preincubando 62.5 mcg/ratón (equivalentes a 3  $DL_{50I.V.}$ ) del veneno con diferentes cantidades del antiveneno (Tabla 3). Además, del ratón control al cual se le administraron  $3DL_{50I.V.}$  sin antiveneno. La lectura de sobrevivencia se tomó a las 24 h post-inoculación.

Tabla 3. Determinación de la  $DE_{50}$  preincubando veneno-antiveneno

Dosis de reto ( $3DL_{50I.V.}$ ) = 62.5 mcg/ratón					
Alacramyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 24 h
1	25	2.7	0.07	0/6	0
2	50	2.7	0.14	0/6	0
3	75	2.7	0.20	0/6	0
4	100	2.7	0.27	0/6	0
5	200	2.7	0.54	0/6	0
6	250	2.7	0.68	1/6	16.7
7	285	2.7	0.77	4/6	66.7
8	300	2.7	0.81	4/6	66.7
9	350	2.7	0.95	6/6	100

El valor de la  $DE_{50}$ , preincubando con  $3DL_{50I.V.}$ , fue determinado a partir de la curva dosis respuesta como se muestra en la Figura C (Apéndice 1), obteniéndose un valor de 0.75 mg/ $3DL_{50I.V.}$  (I.C 95 % 0.73 a 0.76). En los ratones sobrevivientes se observaron ligeros síntomas de envenenamiento como prurito nasal e hiperactividad, sin embargo, estos se recuperaron en menos de 30 minutos. Por su parte, el ratón control murió casi al instante de la inoculación.

**b) DE<sub>50</sub> preincubando con 2DL<sub>50I.V.</sub>**

Para determinar la DE<sub>50</sub> de Alacramyn® que neutraliza a 2DL<sub>50S.C.</sub> (41.6 mcg/ratón), se inocularon a cinco grupos de seis ratones vía intravenosa con las mezclas (veneno-antiveneno) y un ratón control al que sólo se le inoculo el veneno (41.6 mcg). Se tomó lectura de la sobrevivencia a las 24 h posteriores a la inoculación (Tabla 4).

Tabla 4. Determinación de la DE<sub>50</sub> preincubando veneno-antiveneno

Dosis de reto (2DL <sub>50I.V.</sub> ) = 41.6 mcg/ratón					
Alacramyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 24 h
1	40	2.7	0.11	0/6	0
2	50	2.7	0.14	1/6	16.7
3	75	2.7	0.20	2/6	33.3
4	100	2.7	0.27	5/6	83.3
5	200	2.7	0.54	6/6	100

La DE<sub>50</sub>, preincubando con 2DL<sub>50I.V.</sub>, se determinó a partir de la curva dosis respuesta como se muestra en la Figura D (Apéndice 1), obteniéndose un valor fue de 0.21 mg/2DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95 % 0.19 a 0.25). Cabe resaltar que la DE<sub>50</sub> con 2DL<sub>50I.V.</sub> fue 3 veces menor que el obtenido para 3DL<sub>50I.V.</sub>. Asimismo, el tiempo de muerte fue de 15 a 75 minutos. Mientras que en aquellos grupos donde hubo sobrevivientes, éstos no mostraron ningún síntoma de envenenamiento. Por su parte, el ratón control murió a los 10 minutos posteriores a la inoculación.

**8.1.4 Ensayos de “rescate” por diferentes vías de administración.**

Con la finalidad de garantizar que la dosis del veneno de reto en los ensayos de rescate es suficiente para causar el 100 % de mortalidad, y que por lo tanto, la sobrevivencia observada corresponde únicamente a los efectos terapéuticos del antiveneno; se inoculó un grupo de cinco ratones con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> (62.4 mcg/ratón). Los resultados mostraron que con esta dosis la mortalidad es de 100 %, dado que no sobrevivió ningún ratón.

Por lo cual, fue esta la dosis de reto que se administró en los ensayos de rescate que a continuación se describen.

**a) Ensayo de “rescate” por vía intravenosa.**

Con base en las condiciones descritas antes, se inocularon 5 grupos de ratones con 2DL<sub>50S.C.</sub>. A continuación, se realizó el rescate administrando distintas cantidades del antiveneno (ver Tabla 5), por vía I.V., a los 10 minutos post-envenenamiento. El ratón control se inoculó con 2DL<sub>50S.C.</sub> pero no se le administró antiveneno. Todas las lecturas de sobrevivencia se determinaron a las 24 hrs.

Tabla 5. Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía intravenosa.

Dosis de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 62.4 mcg/ratón					
Alacramyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 24 h
1	100	2.7	0.27	0/6	0
2	200	2.7	0.54	0/6	0
3	300	2.7	0.81	3/6	50
4	400	2.7	1.0	5/6	83.3
5	550	2.7	1.5	6/6	100

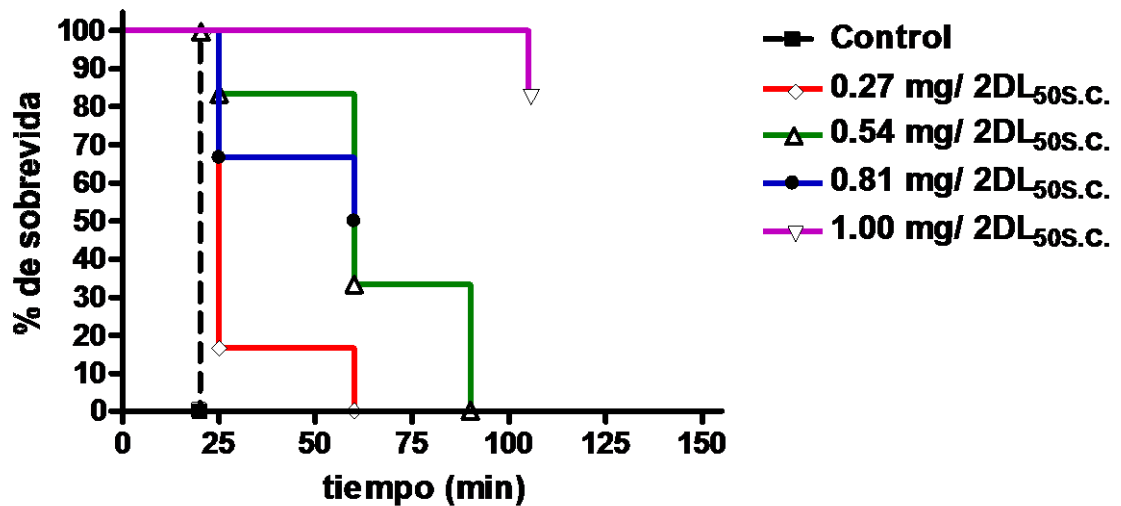
Como en los casos anteriores, la DE<sub>50I.V.</sub> de rescate se obtuvo a partir de la curva dosis respuesta de la Figura E (Apéndice 1), obteniéndose un el valor de 0.82 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95 % 0.76 a 0.87). En los grupos 1 y 2 se observaron los típicos síntomas de envenenamiento

Al determinar la cinética de la muerte en los animales, como se observa en la Tabla 6, hay un retraso en la muerte de los ratones que recibieron las mayores dosis de antiveneno, aunque finalmente fallecieron. Mientras los ratones control y con la menor dosis de antiveneno, fallecieron dentro de los primeros 25 min, los ratones con la mayor dosis de antiveneno fallecieron entre los 90 y 105 minutos. Estos resultados fueron analizados en la Gráfica 1, donde se graficó el porcentaje de mortalidad acumulado contra el tiempo en el cual murieron los ratones de cada grupo inoculado. Como se observa en la

gráfica, el tiempo de muerte se prolonga, con respecto al control, y disminuye el porcentaje de mortalidad por grupo conforme aumenta la cantidad de antiveneno administrado. Esto sugiere que aunque la cantidad de antiveneno administrado no es suficiente para neutralizar todo el veneno, sí logra neutralizar una fracción de este por lo que se retrasa la evolución del envenenamiento en comparación con el control donde no se aplica antiveneno.

Tabla 6. Tiempo de muerte en el rescate I.V. con Alacramyn®

Tiempo (min.)	20	25	60	90	105
	<b>Mortalidad (%)</b>				
<b>Control</b>	100	0	0	0	0
<b>0.27 mg</b>	0	83	17	0	0
<b>0.54 mg</b>	0	17	50	33	0
<b>0.81 mg</b>	0	33	17	0	0
<b>1.00 mg</b>	0	0	0	0	17



Gráfica 1. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.V. con Alacramyn® retando con 2DL<sub>50</sub>s.c.

### **b) Ensayo de “rescate” vía intraperitoneal.**

Se realizó retando con el equivalente  $2DL_{50S.C.}$  (62.4 mcg/ratón) y rescatando con distintas cantidades de antiveneno por vía intraperitoneal (Tabla 7). El rescate se realizó a los 5 minutos posteriores a la inoculación del veneno. Se inoculó un ratón control la misma cantidad de veneno vía subcutánea pero no fue rescatado con el antiveneno.

El antiveneno se reconstituyó en 1 mL de solución salina, para poder administrar mayores cantidades de antiveneno en menor volumen.

Tabla 7. Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía intraperitoneal.

Dosis de reto ( $2DL_{50S.C.}$ ) = 62.4mcg/ratón					
Alacramyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 24 h
1	100	13.5	1.3	0/6	0
2	200	13.5	2.7	0/6	0
3	300	13.5	4.0	3/6	50
4	400	13.5	5.4	4/6	66.7
5	500	13.5	6.7	6/6	100

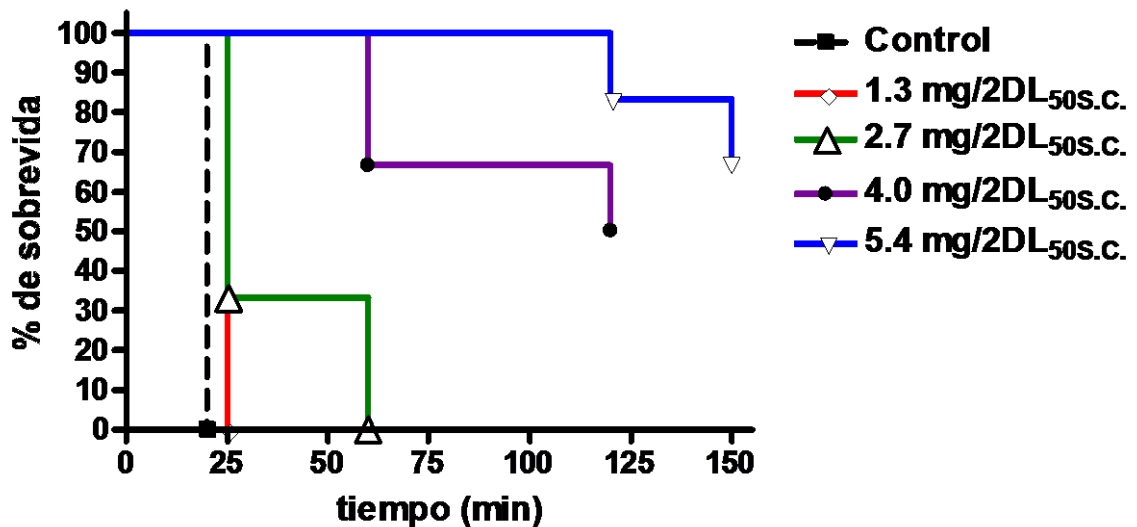
Como se observa en la Figura F (Apéndice 1), la  $DE_{50I.P.}$  de rescate fue de 4.5 mg/ $2DL_{50S.C.}$  (I.C 95 % 3.78 a 5.30). Esto es, presentó una capacidad terapéutica en los ratones aproximadamente 5 veces menor que al intentar rescatar por vía IV.

Por su parte, al evaluar a los animales observamos que los grupos 1 al 2 presentaron los síntomas típicos del envenenamiento a los 15 minutos y la mortalidad desde los 25 minutos hasta 60 minutos post-envenenamiento. El grupo 3 murieron entre los tiempos 26 y 120 min. Mientras que en el grupo 4, los ratones murieron desde los 60 min post-inyección. De este grupo uno de los ratones falleció hasta los 150 minutos post-envenenamiento (Tabla 8). Los ratones sobrevivientes se recuperaron de manera total hasta las 24 h. El ratón control murió a los 12 minutos posteriores a la inoculación.

Tabla 8. Tiempo de muerte en el rescate I.P. con Alacramyn®.

Tiempo (min.)	20	25	60	120	150
	<b>Mortalidad (%)</b>				
<b>Control</b>	100	0	0	0	0
<b>1.3 mg</b>	0	100	0	0	0
<b>2.7 mg</b>	0	67	33	0	0
<b>4.0 mg</b>	0	0	33	17	0
<b>5.4 mg</b>	0	0	0	17	17

La Gráfica 2 muestra la tendencia del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.P. Se observa aumento en el tiempo en el cual mueren los ratones conforme aumenta la dosis. En este caso el tiempo de muerte se prolonga hasta los 150 minutos con respecto al rescate I.V., donde el tiempo de muerte más largo fue de 105 minutos. Sin embargo, las dosis de antiveneno que fueron administradas en el rescate intraperitoneal son mayores que en el intravenoso.



Gráfica 2. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.P. con Alacramyn® retando con 2DL<sub>50s.c.</sub>

**c) Ensayo de “rescate” vía intramuscular.**

Como en la serie de ensayos precedentes, se retó los diferentes grupos de ratones con el equivalente 2DL<sub>50S.C.</sub> (62.4 mcg/ratón). Cinco-siete minutos después de la inoculación, se administraron distintas cantidades de antiveneno por vía intramuscular, en el músculo posterior de la pata trasera (Tabla 9). Además se inoculó un ratón con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> y no se le administró antiveneno, el cual fue considerado como control. El antiveneno fue reconstituido en un volumen ≤1mL.

Tabla 9. Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía intramuscular.

Dosis del veneno de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 62.4 mcg/ratón					
Grupo	Alacramyn®			No. De vivos	Sobrevivencia (%) 24 h
	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)		
1	100	13.5	1.3	0/6	0
2	200	13.5	2.7	0/6	0
3	300	13.5	4.0	1/6	16.7
4	200	27	5.4	1/6	16.7
5	*(2)150	27	8.1	3/6	50

\* Se administraron 150 mcL del antiveneno en dos puntos (uno en cada muslo de las patas traseras).

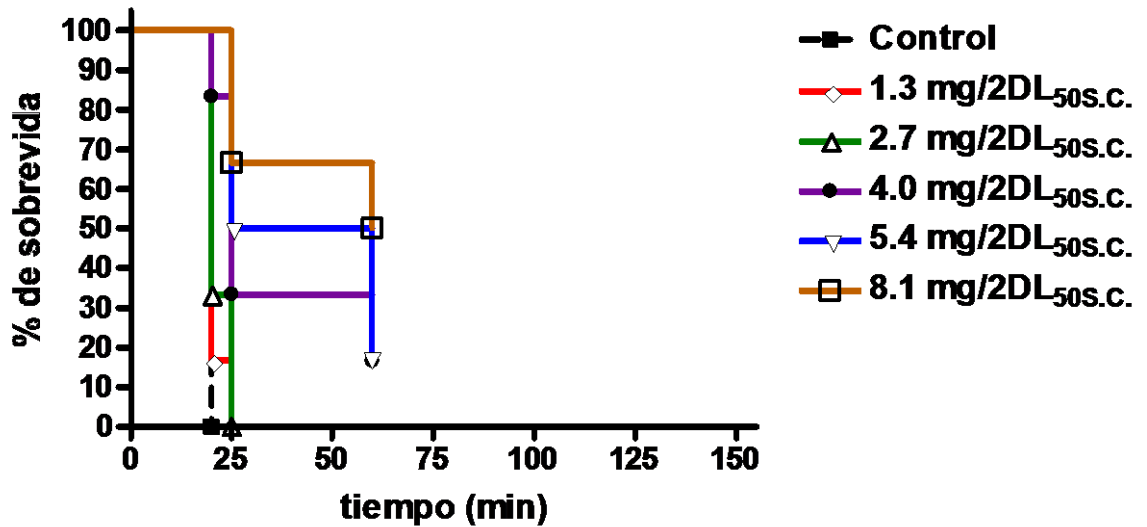
En este caso no fue posible determinar la DE<sub>50</sub>, dado que el rescate de los animales por la vía intramuscular fue parcial, ya que cuando se administró la mayor cantidad posible de antiveneno en el músculo del ratón, sólo lograron sobrevivir el 50 % de los animales. La muerte de los animales ocurrió desde los 20 minutos hasta los 65 minutos (Tabla 10). El ratón control murió a los 10 minutos posteriores a la inoculación. Los ratones sobrevivientes se recuperaron de manera total después de 24 h.



Tabla 10. Tiempo de muerte en el rescate I.M. con Alacramyn®.

Tiempo (min.)	20	25	60
	<b>Mortalidad (%)</b>		
Control	100	0	0
1.3 mg	83	17	0
2.7 mg	67	33	0
4.0 mg	17	50	17
5.4 mg	0	50	33
8.1 mg	0	33	17

En la Gráfica 3 se muestra la tendencia del tiempo de muerte en el ensayo de rescate por vía intramuscular. Aún cuando el rescate por esta vía sólo fue parcial, se observa un retraso en el tiempo de muerte con respecto al control. Por esta vía la muerte se prolongó hasta una hora con las dosis mayores.



Gráfica 3. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.M. con Alacramyn® retando con 2DL<sub>50</sub>s.c.

**d) Ensayo de “rescate” vía subcutánea.**

Estos ensayos se realizaron retando con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> (62.4 mcg/ratón) y rescatando con distintas cantidades de antiveneno por vía subcutánea, a 1.5 cm del sitio de inyección del veneno (Tabla 11). Se inoculó un ratón control, con la misma cantidad de veneno, pero no se le administró el antiveneno. El rescate se realizó a los 5 minutos posteriores a la inoculación del veneno.

Tabla 11. Ensayo de rescate con Alacramyn® por vía subcutánea.

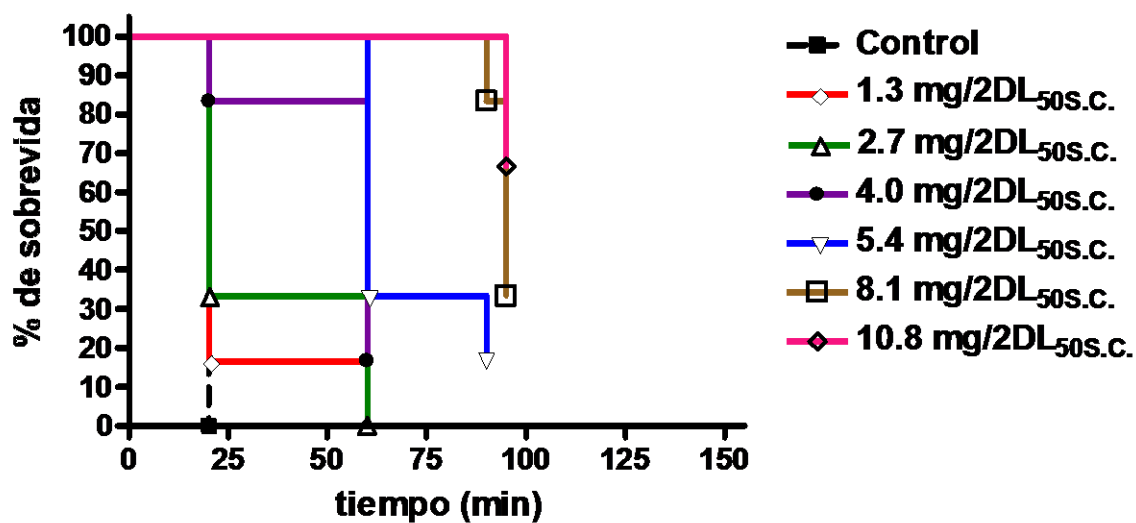
Dosis de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 62.4 mcg/ratón					
Alacramyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 24 h
1	500	2.7	1.3	0/6	0
2	500	5.4	2.7	0/6	0
3	300	13.5	4.0	1/6	17
4	400	13.5	5.4	1/6	17
5	600	13.5	8.1	2/6	30
6	800	13.5	10.8	2/6	30

Como se observa en la Tabla 11, el rescate de los animales por la vía subcutánea fue parcial, dado que sólo sobrevivió el 33 % de los animales al administrar un máximo de 10.8 mg del antiveneno. Por su parte, la muerte de los animales se observó desde los 20 minutos hasta los 95 minutos. Asimismo, se observaron claramente los síntomas de envenenamiento 15 minutos post-inyección, en los grupos con las dosis más altas de antiveneno, como se puede observar en la Tabla 12. El ratón control murió a los 9 minutos posteriores a la inoculación del veneno.

Tabla 12. Tiempo de muerte en el rescate S.C. con Alacramyn®.

Tiempo (min.)	20	60	90	95
Mortalidad (%)				
Control	100	0	0	0
1.3 mg	83	17	0	0
2.7 mg	67	33	0	0
4.0 mg	17	67	0	0
5.4 mg	0	67	17	0
8.1 mg	0	0	17	50
10.8 mg	0	0	0	33

En la Gráfica 4 se muestra la cinética del tiempo de muerte en el ensayo de rescate por vía S.C. El tiempo de muerte se prolongó hasta los 90 minutos con la mayor dosis de antiveneno (10.8 mg/ratón). Así también, se observa que aún en los casos en los que el antiveneno no puede evitar la muerte este se retrasó con respecto al control.



Gráfica 4. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate S.C. con Alacramyn® retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.

## 8.2 Resumen de los ensayos de Alacramyn® vs veneno de *C. limpidus*.

En la Tabla 13 se muestra el resumen de los resultados de las DL<sub>50s</sub> por vía I.V. y S.C.; y las DE<sub>50s</sub> preincubando el antiveneno con el equivalente a dos y tres DL<sub>50I.V.</sub> respectivamente. En la Tabla 14 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de rescate con Alacramyn por diferentes vías de administración.

Tabla 13. Resumen de las DL<sub>50s</sub> de *C. limpidus* y las DE<sub>50s</sub> del Alacramyn®.

<b><i>C. limpidus</i></b>	
DL <sub>50</sub> Intravenosa	21 mcg/ratón (I.C 95 % 17 a 25)
DL <sub>50</sub> Subcutánea	31 mcg/ratón (I.C 95 % 29 a 33)
<b>Alacramyn®</b>	
DE <sub>50</sub> (preincubación con 3DL <sub>50I.V.</sub> )	0.75 mg/3DL <sub>50I.V.</sub> (I.C 95 % 0.73 a 0.76)
DE <sub>50</sub> (preincubación con 2DL <sub>50I.V.</sub> )	0.21 mg/2DL <sub>50I.V.</sub> (I.C 95 % 0.19 a 0.25)

Tabla 14. Resumen de los ensayos de rescate (Alacramyn® vs *C. limpidus*).

Ensayo	No DL <sub>50s</sub> de reto	Veneno (mcg/ratón)	Alacramyn® (mg/2DL <sub>50S.C.</sub> )
Intravenosa	2DL <sub>50S.C.</sub>	61.4	<b>0.82</b> (I.C 95 % 0.76 a 0.87)
Intraperitoneal	2DL <sub>50S.C.</sub>	61.4	<b>4.50</b> (I.C 95 % 3.78 a 5.30)
Intramuscular	2DL <sub>50S.C.</sub>	61.4	<b>8.40</b> (*50%)
Subcutánea	2DL <sub>50S.C.</sub>	61.4	<b>10.70</b> (*30%)

\*Porcentaje de sobrevivencia con esta dosis.

### **8.3 Ensayos Antivipmyn® vs veneno de *C. atrox*.**

#### **8.3.1 Determinación de la concentración del veneno de *C. atrox*.**

Se preparó un stock del veneno, pesando 5.18 mg del liofilizado y reconstituyendo en 5 mL de solución salina (150 mM). Lo correspondiente  $A_{280}$  fue de 1.02, por lo que la concentración de proteína, por ambos métodos, fue de 1mg/mL.

#### **8.3.2 Determinación de la letalidad del veneno de *C. atrox*.**

##### **a) DL<sub>50</sub> por vía intravenosa.**

Para este ensayo, las diferentes cantidades de veneno fueron inoculadas por vía intravenosa, en la vena de la cola. La determinación del DL<sub>50</sub> fue obtenida por la mortalidad de cada grupo de animales, a las 48 h postratamiento, como se observa en la Tabla 15.

Tabla 15. Determinación de la DL<sub>50</sub> de *C. atrox* por vía intravenosa.

<b>Grupo</b>	<b>Veneno (mcg/ratón)</b>	<b>No. De muertos</b>	<b>Mortalidad (%) 48 h</b>
<b>1</b>	30	0/6	0
<b>2</b>	50	1/6	16.67
<b>3</b>	65	2/6	33.3
<b>4</b>	80	4/6	66.7
<b>5</b>	100	6/6	100

Como se observa en la Figura A (Apéndice 2), la DL<sub>50i.v.</sub> se determinó con la curva dosis, obteniéndose un valor de 71 mcg/ratón (I.C 95 % 64 a 74). Por otra parte, los síntomas de envenenamiento se presentaron a los 15 minutos post-inoculación, con aislamiento e inactividad. Después de 25 minutos se observó coloración oscura en la parte abdominal que sugiere hemorragias internas provocadas por el veneno. Las primeras muertes, en general, sucedieron a los 25 minutos con las dosis altas y hasta 12 h post-inoculación con las dosis más bajas. El ratón control, inoculado sólo con 500 mL de solución salina, no presentó síntoma de envenenamiento y se mantuvo vivo a las 48 h.

**b) DL<sub>50</sub> por vía subcutánea.**

Para la determinación del DL<sub>50</sub> por vía subcutánea con el veneno de *C. atrox*, el veneno fue inoculado a seis grupos de seis ratones cada uno. Después de 48 h se tomó la lectura del ensayo de mortalidad, como se observa en la Tabla 16.

Tabla 16. Determinación de la DL<sub>50</sub> de *C. atrox* por vía Subcutánea.

<b>Grupo</b>	<b>Veneno (mcg/ratón)</b>	<b>No. De muertos</b>	<b>Mortalidad (%) 48 h</b>
<b>1</b>	70	0/6	0
<b>2</b>	100	0/6	0
<b>3</b>	150	1/6	16.7
<b>4</b>	200	2/6	33.3
<b>5</b>	300	5/6	83.3
<b>6</b>	350	6/6	100

La DL<sub>50S.C.</sub>, se determinó a partir de la curva dosis respuesta, como se observa en la Figura B (Apéndice 2), obteniendo un valor de 220 mcg/ratón (I.C 95 % 201 a 240). Cabe resaltar que este resultado fue 3 veces mayor que el obtenido por vía IV. Asimismo, al evaluar la conducta de los animales, estos mostraron aislamiento e inactividad a los 30 minutos post-inoculación y transcurridos 35 minutos se observó coloración oscura en la parte abdominal. La muerte de los animales ocurrió entre los 35 y 50 minutos con las dosis altas; sin embargo, algunos ratones inoculados con las dosis menores murieron hasta las 18 h post-inoculación. El ratón control no mostró ningún síntoma de envenenamiento.

### 8.3.3 Ensayos de neutralización preincubando veneno-antiveneno.

#### a) DE<sub>50</sub> preincubando con 3DL<sub>50I.V.</sub>

En este experimento se incubó la cantidad equivalente a 3DL<sub>50I.V.</sub> (212 mcg/ratón) durante 30 min a 37 °C, con distintas cantidades de antiveneno (ajustando el volumen a 500 mcL por ratón con solución salina). Posteriormente se administró por vía I.V. a siete grupos de seis ratones, la mezcla correspondiente (Tabla 17). Se tomó lectura a las 48 h.

Tabla 17. DE<sub>50</sub> preincubando veneno-antiveneno y retando con 3DL<sub>50I.V.</sub>

Dosis de reto (3DL <sub>50I.V.</sub> ) = 212 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	50	9.2	0.46	0/6	0
2	100	9.2	0.92	0/6	0
3	150	9.2	1.38	2/6	33.3
4	200	9.2	1.84	3/6	50
5	250	9.2	2.30	4/6	66.7
6	300	9.2	2.76	4/6	66.7
7	350	9.2	3.22	6/6	100

La DE<sub>50</sub>, preincubando con 3DL<sub>50I.V.</sub>, se determinó con la curva dosis-respuesta, como se muestra en la Figura C (Apéndice 2), obteniéndose un valor de 1.85 mg/3DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95 % 1.57 a 2.18). Los ratones con las dosis más bajas de antiveneno murieron de cinco a 10 minutos después de la inoculación. En los grupos 4,5 y 6 los ratones que no sobrevivieron murieron en periodos más largos, hasta 120 minutos post-inoculación. En el grupo siete sobrevivieron todos los ratones y no se observaron síntomas de envenenamiento. El ratón control, al cual sólo se le administró la misma cantidad de veneno que a los demás y no se le administró antiveneno, murió a los 12 minutos.

### **b) DE<sub>50</sub> preincubando con 2DL<sub>50I.V.</sub>**

Como se verá más adelante, los experimentos de rescate retando con 3DL<sub>50S.C.</sub>, por vías diferentes a la I.V., requirieron cantidades muy grandes de antiveneno por lo que decidimos utilizar 2DL<sub>50S.C.</sub> y resultaba importante contar con el valor de la DE<sub>50</sub> en experimento de preincubación. Los datos de estos experimentos se dan en la Tabla 18.

Tabla 18. DE<sub>50</sub> preincubando veneno-antiveneno y retando con 2DL<sub>50I.V.</sub>

Dosis de reto (2DL <sub>50I.V.</sub> ) = 142 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	40	9.2	0.37	0/6	0
2	50	9.2	0.46	1/6	16.7
3	70	9.2	0.64	2/6	33.3
4	85	9.2	0.78	5/6	83.3
5	100	9.2	0.92	6/6	100

La DE<sub>50</sub>, preincubando con 2DL<sub>50I.V.</sub>, se determinó con la curva dosis respuesta (ver Figura D, Apéndice 2). El valor hallado fue de **0.68 mg/2DL<sub>50I.V.</sub>** (I.C 95% de 0.61 a 0.74). Los ratones del grupo 1,2 y 3 mostraron los síntomas de envenenamiento característicos de este veneno y los que se recuperaron lo hicieron a las 24 h post-inoculación. Los ratones del grupo 4 mostraron aislamiento durante los primeros 30 min y después se recuperaron. El ratón control (sin antiveneno) murió 20 min después de la inoculación.

#### **8.3.4 Ensayos de “rescate” por diferentes vías de administración.**

##### **a) Ensayo de “rescate” por vía intravenosa a 20 minutos.**

Se planteó realizar el rescate con Antivipmyn® a los 20 minutos post-envenenamiento, dado que la muerte de los ratones envenenados ocurría alrededor de los 30 minutos. Sin embargo, se observó a este tiempo, que las venas se encontraban colapsadas y que resultaba difícil la administración del antiveneno; además, por la misma



razón los resultados no eran reproducibles. Así las cosas, el rescate se replanteó a los 8-10 minutos posteriores a la administración del veneno.

**b) Ensayo de “rescate” por vía I.V. retando con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub>**

Se realizó el ensayo de rescate retando con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub> (604.5 mcg/ratón) del veneno inyectándolo en el lomo y, se rescató con distintas cantidades del antiveneno por vía intravenosa en la vena de la cola (Tabla 19).

Tabla 19. Ensayo de rescate por vía intravenosa retando con 3DL<sub>50S.C.</sub>

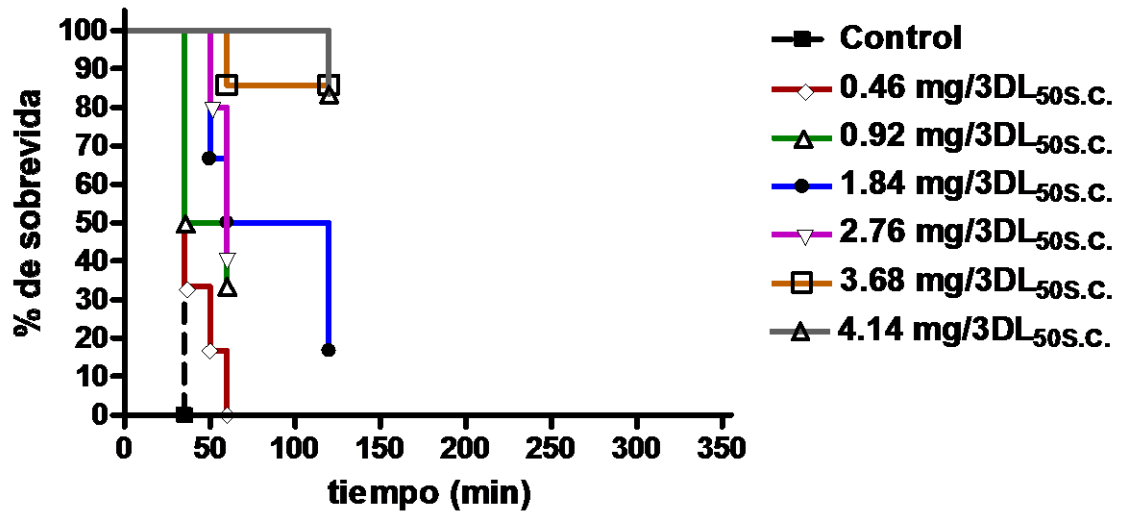
Dosis de reto (3DL <sub>50S.C.</sub> ) = 604.5 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	50	9.2	0.46	0/6	0
2	100	9.2	0.92	2/6	33.3
3	200	9.2	1.84	2/6	33.3
4	300	9.2	2.76	3/6	50
5	400	9.2	3.68	5/6	83.3
6	450	9.2	4.14	5/6	83.3
7	500	9.2	4.60	6/6	100

El valor de la DE<sub>50I.V.</sub>, retando con 3DL<sub>50S.C.</sub>, se determinó con la curva dosis respuesta (ver Figura E, Apéndice 2) y el valor fue de 2.10 mg/3DL<sub>50I.V.</sub> (I.C 95 % 1.40 a 3.13). Cabe resaltar que la DE<sub>50</sub> por esta vía fue similar a la DE<sub>50</sub> que se obtuvo preincubando veneno-antiveneno. Los ratones con las dosis bajas de antiveneno muestran algunos síntomas de envenenamiento, tales como aislamiento y en algunos casos, ligera coloración oscura en el abdomen. La muerte en los grupos del 1 al 3 ocurrió desde los 35 min hasta los 120 min y en los grupos 4 y 5 desde una hasta las 3 h (Tabla 20). El ratón control (sin antiveneno) murió a los 15 minutos.

La Gráfica 5 muestra el comportamiento del tiempo de muerte en los distintos grupos. En cada grupo se observa un retraso en el tiempo de muerte con respecto al control. El retraso es dosis dependiente, dado ésta se prolonga conforme aumenta la cantidad de antiveneno administrada.

Tabla 20. Tiempo de muerte en el rescate I.V. retando con 3DL<sub>50S.C.</sub>

Tiempo (min.)	35	50	60	120
	<b>Mortalidad (%)</b>			
Control	100	0	0	0
0.46 mg	67	17	17	0
0.92 mg	50	0	17	0
1.84 mg	0	33	17	17
2.76 mg	0	17	33	0
3.68 mg	0	0	17	0
4.14 mg	0	0	0	17



Gráfica 5. Progreso del tiempo de muerte en el rescate I.V. con Antivipmyn®, retando con 3DL<sub>50I.V.</sub>

**c) Ensayo de “rescate” por vía I.P. retando con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub>**

En este experimento se retó con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub> (604.5 mcg/ratón) inoculando en el lomo y se rescató con distintas cantidades de antiveneno por vía intraperitoneal (Tabla 21). El antiveneno se reconstituyó en 1 mL de solución salina para poder inyectar la masa necesaria de AV en volumen pequeño.

Tabla 21. Ensayo de rescate por vía intraperitoneal, retando con 3DL<sub>50S.C.</sub>

Dosis del veneno de reto (3DL <sub>50S.C.</sub> ) = 604.5 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	200	9.2	1.84	0/6	0
2	400	46	7.36	0/6	0
3	150	92	13.80	1/6	16.7
4	300	92	27.60	1/6	16.7
5	400	92	36.80	2/6	33.3
6	500	92	46.00	2/6	33.3

Durante el experimento se observó que en los grupos 1, 2 y 3 la muerte de los ratones va desde los 20 hasta los 40 minutos. En los grupos 4, 5 y 6 el tiempo de muerte va desde los 25 minutos hasta las 4 horas post-envenenamiento. En este ensayo no se logró determinar la DE<sub>50</sub> dado que sólo sobrevivió el 33 % de los ratones aún cuando se administraron 46 mg de antiveneno, como cantidad máxima. El ratón control (sin antiveneno) murió a los 15 minutos.

**d) Ensayo de “rescate” por vía S.C. retando con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub>**

Se realizó el ensayo de rescate retando con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub> (604.5 mcg/ratón) inoculando en el lomo y se rescató con distintas cantidades de antiveneno por vía subcutánea aproximadamente a 1.5 cm del sitio de inoculación del veneno (Tabla 22). Se inoculó un ratón con la misma cantidad de veneno y a éste no se le administró antiveneno, para utilizarlo como el control.

Tabla 22. Ensayo de rescate por vía subcutánea retando con 3DL<sub>50S.C.</sub>

Dosis de reto (3DL <sub>50S.C.</sub> ) = 604.5 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Antiveneno (mcg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	500	9.2	4.60	0/6	0
2	100	92	9.20	0/6	0
3	200	92	18.40	1/6	17
4	300	92	27.60	2/6	33
5	400	92	36.80	2/6	33

Los ratones no sobrevivientes de los grupos 1,2 y 3 mueren de 15 a 35 minutos post-envenenamiento. En los grupos 4,5 y 6 los ratones mueren desde los 20 hasta 150 minutos post-envenenamiento. Los ratones sobrevivientes muestran recuperación a las 48 horas. Sin embargo, en el ensayo de rescate por la vía subcutánea no se logró determinar la DE<sub>50</sub> dado que sólo se logró un rescate parcial de 33 % aún cuando se administraron 36.8 mg del antiveneno. El ratón control murió a los 10 minutos.

**e) Ensayo de “rescate” por vía I.V. retando con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub>**

Los ensayos de rescate retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>, se realizaron para determinar, si esta dosis de reto permite que el antiveneno administrado por las vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular; actúe con mayor eficacia en el rescate (Tabla 23).

Tabla 23. Ensayo de rescate por vía intravenosa retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>

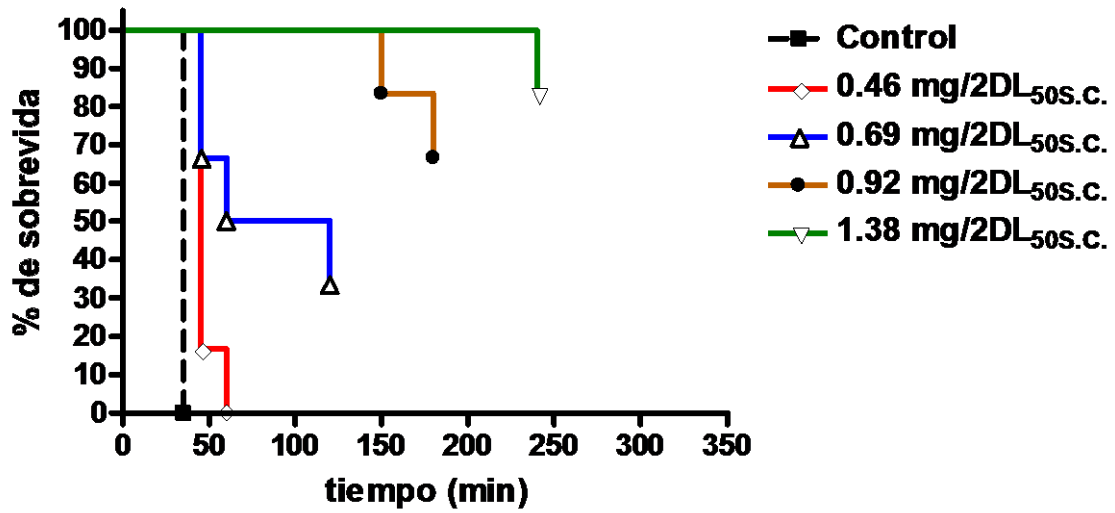
Dosis del veneno de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 440.6 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	50	9.2	0.46	0/6	0
2	75	9.2	0.69	2/6	33.3
3	100	9.2	0.92	4/6	66.7
4	150	9.2	1.38	5/6	83.3
5	180	9.2	1.66	6/6	100

El valor de la DE<sub>50I.V.</sub> de rescate, retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>, se determinó con la curva dosis respuesta (ver la Figura F, Apéndice 2) y el valor fue de 0.81 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95 % 0.70 a 0.93). La dosis efectiva media en este ensayo de rescate fue similar a la que se obtuvo cuando se preincuba veneno-antiveneno. Los ratones mostraron aislamiento en los primeros 20 minutos posteriores al envenenamiento. En los grupos 1 y 2, la muerte de los ratones no sobrevivientes fue desde los 45 min hasta los 120 min. En el grupo 3 y 4 la muerte ocurrió desde los 150 min hasta las 6 h (Tabla 24). El ratón control (sin antiveneno) murió a los 35 min posteriores a la inoculación.

En la Gráfica 6 se observa el retraso en el tiempo de muerte en el ensayo de rescate por vía intravenosa, cuando retamos con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> Como se observa en la gráfica, conforme aumenta la cantidad del Antivipmyn el retraso en el tiempo de muerte es mayor, con respecto al control, por lo cual éste es dosis-dependiente.

Tabla 24. Tiempo de muerte en el rescate I.V. retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.

Tiempo (min.)	35	45	60	120	150	180	240
<b>Mortalidad (%)</b>							
Control	100	0	0	0	0	0	0
0.46 mg	0	83	17	0	0	0	0
0.69 mg	0	33	17	17	0	0	0
0.92 mg	0	0	0	0	17	17	0
1.38 mg	0	0	0	0	0	0	17



Gráfica 6. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.V. con Antivipmyn® retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.

**f) Ensayo de “rescate” por vía I.P. retando con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub>**

Este se realizó retando con 440.6 mcg/ratón de veneno y rescatando con distintas cantidades de antiveneno (Tabla 25) por vía intraperitoneal, de 8-10 minutos posteriores al envenenamiento. El ratón control fue inoculado con la misma dosis de veneno (440.6 mcg), pero no se le administró antiveneno.

Tabla 25. Ensayo de rescate por vía intraperitoneal retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>

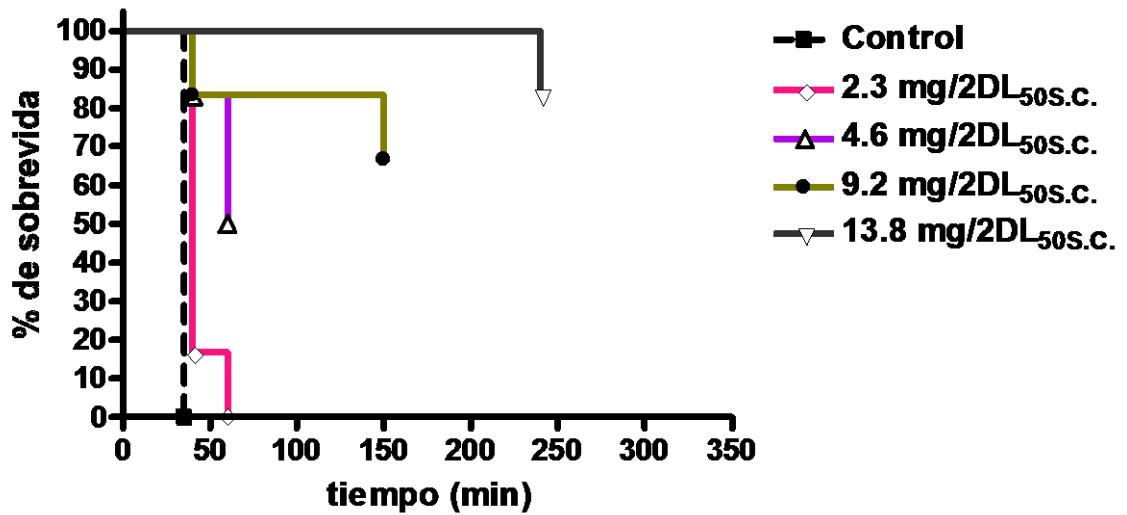
Dosis de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 440.6 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48h
1	250	9.2	2.30	0/6	0
2	500	9.2	4.60	3/6	50
3	100	92	9.20	4/6	66.7
4	150	92	13.80	5/6	83.3
5	200	92	18.40	6/6	100

En el ensayo de rescate I.P. el valor de la DE<sub>50</sub> hallado mediante la curva dosis respuesta (ver la Figura G, Apéndice 2) y fue de 5.7 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95 % 3.50 a 9.20). Los ratones muestran síntomas de envenenamiento tales como aislamiento y desarrollo de lesiones necróticas en el sitio de la inoculación del veneno. En los grupos 1 y 2 la muerte de los ratones no sobrevivientes se observa desde los 40 hasta los 60 min. En los grupos 3 y 4 la muerte ocurrió desde los 40 min hasta las 4 h. El ratón control (sin antiveneno) murió a los 25 min.

En la Tabla 26 y en la Gráfica 7 se muestra el tiempo en el cual mueren los ratones, que no sobreviven con la cantidad de antiveneno administrada. Como se puede observar en la gráfica, el tiempo de la muerte se retrasa hasta cuatro horas con la dosis mayor de antiveneno. El retraso del tiempo de muerte es dosis dependiente.

Tabla 26. Tiempo de muerte en el rescate I.P retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.

Tiempo (min.)	35	40	60	150	240
<b>Mortalidad (%)</b>					
Control	100	0	0	0	0
2.3 mg	0	83	17	0	0
4.6 mg	0	17	33	0	0
9.2 mg	0	17	0	17	0
13.8 mg	0	0	0	0	17



Gráfica 7. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.P. con Antivipmyn® retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.



**g) Ensayo de “rescate” por vía S.C. retando con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub>**

En este experimento se administró el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> (440.6 mcg/ratón) en el lomo del ratón, detrás del cuello y se rescató con distintas cantidades de antiveneno (Tabla 27) por vía subcutánea de 8-10 minutos posteriores al envenenamiento y a 1.5 cm del sitio donde se inoculó el veneno. Se administró un ratón con la misma cantidad de veneno y no se le administró el antiveneno, para utilizarlo como control.

Tabla 27. Ensayo de rescate por vía subcutánea retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>

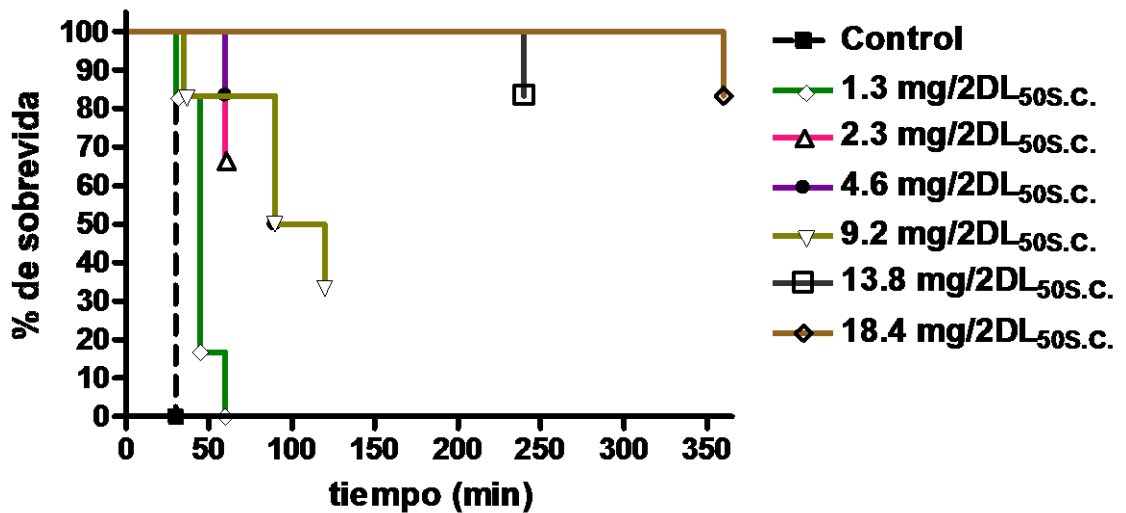
Dosis de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 440.6 mcg/ratón					
Antivipmyn®					
Grupo	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)	No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
1	150	9.2	1.38	0/6	0
2	250	9.2	2.30	2/6	33
3	500	9.2	4.60	3/6	50
4	100	92	9.20	2/6	33
5	150	92	13.80	5/6	83
6	200	92	18.40	5/5	83
7	300	92	27.60	6/6	100

La DE<sub>50</sub> en el rescate S.C. se determinó mediante la curva dosis respuesta (ver la Figura H, Apéndice 2) y el valor fue de 6.16 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> (I.C 95% 3.00 a 12.60). Por su parte, los ratones mostraron los síntomas de envenenamiento característicos de este veneno y los que sobrevivieron se recuperaron a las 24 horas. En los grupos 1,2 y 3 la muerte ocurrió desde los 30 min hasta los 90 min. En los grupos 4,5 y 6 la muerte se observó desde los 30 min hasta las 6 h (Tabla 28). El ratón control (sin antiveneno) murió a los 20 min.

Como se observa en la Gráfica 8, el tiempo de muerte de los ratones no sobrevivientes en el ensayo de rescate por vía subcutánea, cuando retamos con el equivalente a 2DL<sub>50</sub>, se retrasa hasta seis horas con la dosis más alta del antiveneno.

Tabla 28. Tiempo de muerte en el rescate S.C. retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.

Tiempo (min.)	30	35	45	60	90	120	240	360
	<b>Mortalidad (%)</b>							
Control	100	0	0	0	0	0	0	0
1.38 mg	17	0	67	17	0	0	0	0
2.3 mg	0	0	0	17	17	0	0	0
4.6 mg	0	0	0	17	33	0	0	0
9.2 mg	0	17	0	0	33	17	0	0
13.8 mg	0	0	0	0	0	0	17	0
18.4 mg	0	0	0	0	0	0	0	17



Gráfica 8. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate S.C. con Antivipmyn® retando con 2DL<sub>50</sub>S.C.

**h) Ensayo de “rescate” por vía I.M. retando con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub>**

Con la finalidad de probar la capacidad neutralizante del antiveneno, por vía intramuscular, cuando se reta el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> (440.6 mcg/ratón). El antiveneno se reconstituyó en menor volumen de solución salina (1 mL), para poder administrar cantidades grandes de antiveneno en menor volumen. Se inocularon cuatro grupos de ratones (Tabla 29), además de un ratón control al cual se le administró la misma cantidad de veneno que a todos los grupos, pero no se le administro antiveneno.

Tabla 29. Ensayo de rescate por vía intramuscular retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>

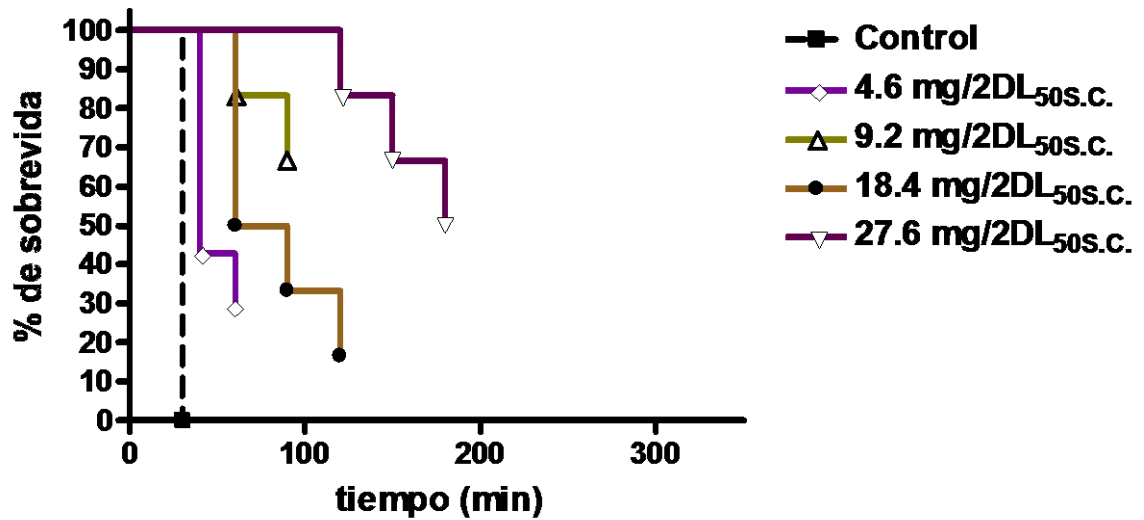
Dosis de reto (2DL <sub>50S.C.</sub> ) = 440.6 mcg/ratón					
Grupo	Antivipmyn®			No. De vivos	Sobrevivencia (%) 48 h
	Volumen (mcL/ratón)	Concentración (mg/mL)	Masa (mg/ratón)		
1	50	92	4.6	0/6	0
2	100	92	9.2	1/6	16.7
3	*(2)100	92	18.4	1/6	16.7
4	*(2)150	92	27.6	3/6	50

\*Se administraron estos volúmenes del antiveneno, en dos puntos de los muslos de las patas traseras.

En el ensayo de rescate por la vía intramuscular cuando retamos con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> sólo se logró un rescate parcial, dado que administrando altas dosis de antiveneno la sobrevivencia fue del 50 % (Tabla 30). Sin embargo, se observa también un retraso en el tiempo de la muerte de hasta tres horas, cuando se administraron 27.6 mg del Antivipmyn® (Gráfica 9) con respecto al control. Los resultados mostraron también que los ratones presentan los síntomas de envenenamiento característicos de este veneno. La muerte de los ratones no sobrevivientes en los grupos 1 y 2 ocurrió desde los 25 hasta los 60 min. En los grupo 3 y 4 la muerte ocurrió desde los 60 hasta los 180 min. El ratón control (sin antiveneno) murió a los 20 min.

Tabla 30. Tiempo de muerte en el rescate I.M. retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>

Tiempo (min.)	25	35	40	60	90	120	150	180
	<b>Mortalidad (%)</b>							
Control	100	0	0	0	0	0	0	0
4.6 mg	17	0	67	17	0	0	0	0
9.2 mg	0	0	0	17	17	0	0	0
18.4 mg	0	0	0	50	17	17	0	0
27.6 mg	0	0	0	0	0	17	17	17



Gráfica 9. Progreso del tiempo de muerte en el ensayo de rescate I.M. con Antivipmyn® retando con 2DL<sub>50S.C.</sub>

### 8.3.5 Resumen de los ensayos de Antivipmyn® vs *C. atrox*.

En la Tabla 31 se muestran los datos obtenidos de las DL<sub>50s</sub> del veneno de *C. atrox* por las vías I.V. y S.C. y las DE<sub>50s</sub> del Antivipmyn® preincubando con dos o tres DL<sub>50s</sub>I.V.. La Tabla 32 muestra los resultados de las DE<sub>50s</sub> de rescate por las vías I.V., I.P., I.M. y S.C. cuando el reto fue con dos o tres DL<sub>50s</sub>C.

Tabla 31. Resumen de *C. atrox* y Antivipmyn.

<b><i>C. atrox</i></b>	
DL <sub>50</sub> Intravenosa	71 mcg/ratón (I.C 95 % 64 a 78)
DL <sub>50</sub> Subcutánea	220 mcg/ratón (I.C 95 % 202 a 240)
<b>Antivipmyn®</b>	
DE <sub>50</sub> (preincubación con 3DL <sub>50</sub> I.V.)	1.85 mg/3DL <sub>50</sub> I.V. (I.C 95 % 1.57 a 2.18)
DE <sub>50</sub> (preincubación con 2DL <sub>50</sub> I.V.)	0.68 mg/2DL <sub>50</sub> I.V. (I.C 95 % 0.61 a 0.74)

Tabla 32. Resumen de los ensayos de rescate retando con 3DL<sub>50s</sub>C.

Ensayo	No DL <sub>50s</sub> de reto	Veneno (mcg/ratón)	Antivipmyn (mg/2DL <sub>50s</sub> C.)
Intravenosa	3DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>2.10</b> (I.C 95 % 1.40 a 3.13)
Intraperitoneal	3DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>46.00</b> (*30 %)
Subcutánea	3DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>36.80</b> (*30 %)
Intravenosa	2DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>0.81</b> (I.C 95 % 0.70 a 0.93)
Intraperitoneal	2DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>5.70</b> (I.C 95 % 3.50 a 9.20)
Subcutánea	2DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>6.16</b> (I.C 95 % 3.00 a 12.60)
Intramuscular	2DL <sub>50s</sub> C.	440	<b>27.60</b> (*50 %)

\*Porcentaje de ratones vivos con esta dosis.

## **9 DISCUSION DE RESULTADOS.**

Como se menciona en los antecedentes, la determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) nos indica la cantidad de una sustancia, que administrada una sola vez, provoca la muerte en el 50 % de la población en un grupo de prueba. La determinación de letalidad de los venenos de *C. limpidus* y *C. atrox* por la vía I.V. permitió conocer su toxicidad cuando se encuentra 100 % biodisponible en sangre; sin embargo, de manera natural la inoculación del veneno ocurre casi siempre por vía subcutánea, por lo tanto, fue necesario determinar también la DL<sub>50</sub> por esta vía dado que es así, como se realizó el envenenamiento en ensayos de rescate. Con el veneno de *C. limpidus*, se encontró, que la diferencia entre las DL<sub>50</sub> subcutánea es 1.5 veces mayor comparada con la intravenosa. Por lo cual, en el caso particular de este veneno, implicaría que la absorción y distribución de las toxinas administrando el veneno de forma S.C., es casi completa y rápida. Este fenómeno puede deberse al bajo peso molecular de las toxinas, alrededor de los 7 kDa (Revelo *et al.*, 1996), favoreciendo la entrada de éstas al torrente sanguíneo en poco tiempo.

En el caso del veneno de *C. atrox*, encontramos que el valor de la DL<sub>50</sub> por vía subcutánea es tres veces mayor que la intravenosa, sugiriendo que la distribución el veneno de *C. atrox* desde el sitio de inyección hasta su blanco, es lenta y parcial; consistente con el hecho de que el tamaño de las moléculas en el veneno de *C. atrox*, son de mediano y alto peso molecular (20-60 kDa) (Bjarnason, 1978); por lo cual, podrían tener un mayor tiempo de residencia en el sitio de inoculación reduciendo la biodisponibilidad del veneno.

Los experimentos de rescate utilizando vías de administración diferentes a la I.V. tales como, la I.P., la S.C. y la I.M., son relevantes debido a que se conoce que bajo circunstancias especiales donde no se tiene la facilidad de la administración I.V se recurre a la vía I.M., sin embargo, existe controversia en cuanto a la capacidad neutralizante del AV administrado por esta vía (Isbister *et al.*, 2007).

Inicialmente, para poder garantizar que los antivenenos induzcan un efecto terapéutico, los ensayos de rescate se deben realizar aplicando dosis de veneno que asegure el 100 % de mortalidad del grupo en estudio. En una primera instancia, para el caso de *C. limpidus*, se realizó un ensayo de rescate aplicando el equivalente de veneno

de  $3DL_{50S.C.}$ , sin embargo la muerte de los ratones fue casi instantánea, dificultando evaluar el efecto del antiveneno. Por esto se realizó un segundo experimento inoculando un equivalente  $2DL_{50S.C.}$  del mismo veneno. En esas condiciones, se observó que la mortalidad fue del 100 % después de 20 minutos post-inyección; permitiéndonos tener una ventana de tiempo más adecuada para evaluar el efecto de rescate del antiveneno. De esta manera, todos los experimentos de rescate del efecto tóxico del veneno de *C. limpidus* con Alacramyn se realizaron retando con  $2DL_{50S.C.}$

En el rescate por vía I.V. se encontró que la neutralización del veneno es similar, si se compara con aquella donde se preincuba la mezcla veneno-antiveneno. Esto se sugiere que el antiveneno administrado directamente en sangre se distribuye de manera rápida, efectuando así, la neutralización de las toxinas circulantes, y promoviendo la salida y neutralización de aquellas que se encuentran en tejido profundo y su neutralización (Riviere *et al.*, 1996).

En el rescate por vía intraperitoneal con Alacramyn® la  $DE_{50}$  fue de  $4.5 \text{ mg}/2DL_{50S.C.}$ , que es 5.5 veces mayor que la encontrada por vía I.V. ( $0.82 \text{ mg}/2DL_{50S.C.}$ ). La diferencia puede deberse a los diversos fenómenos involucrados en la absorción y distribución del antiveneno, desde el tejido donde se administro hasta alcanzar el torrente sanguíneo, ya que en la administración de fármacos u otras proteínas terapéuticas utilizando vía distintas a la intravenosa se ha demostrado que su biodisponibilidad esta disminuida debido a que implica el proceso de absorción (Velázquez, 2004). Por vía subcutánea el rescate fue parcial dado que sólo se logró rescatar al 33% de los animales, administrando hasta  $10.7 \text{ mg}/2DL_{50S.C.}$ . La irrigación sanguínea en el sitio de la administración puede ser importante en la absorción y distribución del antiveneno, ya que se ha observado en la administración de otros biofármacos que esta irrigación así como la circulación linfática son importantes para una buena absorción del biofármaco. Considerando que en tejido subcutáneo esta irrigación no está tan favorecida como en otros sitios de administración parenteral; entonces, su absorción se ve disminuida (Goodman y Gilman, 1996). Esta aseveración coincide con los resultados del rescate por vía intraperitoneal, donde se sabe que existe abundante irrigación sanguínea, y el antiveneno mostró mayor capacidad de rescate. Además el tamaño de los fragmentos  $F(ab')_2$  que componen el antiveneno (~100 kDa) permiten predecir que su absorción debe ser mayoritariamente linfática hecho que retrasaría significativamente su llegada al lecho sanguíneo.

El rescate con Alacramyn® por vía intramuscular, es de particular interés para nosotros, debido a reportes de casos de envenenamiento por picadura de alacrán en humanos, en los cuales, se administró vía intramuscular el antiveneno y los resultados parecen ser satisfactorios.

En el rescate por vía intramuscular, en ratones, se encontró que éste ocurre de manera parcial, debido a que sobrevivió el 50 % de la población, administrando hasta 8.4 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> del antiveneno. Estos resultados no coinciden con las observaciones de los pacientes, donde la aplicación del antiveneno por vía I.M. da aparentes resultados satisfactorios; a este respecto, se ha visto en estudios con fármacos de administración intramuscular que la absorción por esta vía depende entre otros elementos, de las propiedades fisicoquímicas de la molécula administrada, así como de la superficie de administración y la irrigación sanguínea y linfática en el tejido (Goodman y Gilman, 1996). Dado que anatómicamente, la superficie muscular y la irrigación sanguínea del ratón es diferente a la del humano, se podría esperar que la capacidad neutralizante del Alacramyn por vía muscular será menor en el ratón que en el humano. Esto explicaría la diferencia entre este ensayo y las observaciones en la clínica, en donde a pesar de no contar con datos precisos, se considera que la administración intramuscular del antiveneno tiene capacidad neutralizante, disminuyendo, así, el envenenamiento severo por piquete de alacrán.

En humanos, aunque no se tienen datos precisos, se sabe que la administración intramuscular del antiveneno muestra capacidad neutralizante y que disminuye, así, la posibilidad de envenenamiento severo por piquete de alacrán.

Por otra parte, como ya se mencionó, la capacidad de rescate por las vías I.P., I.M. y S.C., es menor con respecto a la intravenosa; sin embargo, sí se observó un retraso en el tiempo de muerte con respecto al control. Esto sugiere que a pesar de que el antiveneno no tiene la misma capacidad neutralizante por vías distintas a la intravenosa, sí está neutralizando de manera parcial el veneno. Esto puede ser muy importante, si consideramos que en algunas comunidades las personas que han sido picadas por alacrán, no siempre tienen rápido acceso a centros de salud donde se les pueda administrar el antiveneno intravenosamente y, por lo tanto, el uso de otra vía de administración parenteral, como la intramuscular, puede ser una alternativa que evite la



aparición de los efectos graves que ponen en riesgo la vida y permitir ganar tiempo para encontrar ayuda médica.

Los ensayos de rescate con Antivipmyn® en ratones envenenados con el veneno de *C. atrox*, se realizaron inicialmente retando con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub>, debido a que la muerte podía tardar hasta 30 minutos, permitiéndonos realizar el rescate.

Por vía intravenosa, la capacidad de rescate del antiveneno fue similar a la determinada preincubando la mezcla veneno-antiveneno. Como se mencionó anteriormente, es necesario que el antiveneno alcance rápidamente el torrente sanguíneo para neutralizar a las toxinas y revertir así el envenenamiento, por lo tanto, en el rescate vía intravenosa existe alta capacidad neutralizante del antiveneno, dado que los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se encuentran disponibles de manera inmediata, para neutralizar las toxinas del veneno.

Cuando se realizó el rescate de los animales envenenados con equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub>, por las vías intraperitoneal y subcutánea, la capacidad neutralizante fue parcial dado que sólo sobrevivió el 33 % del grupo de prueba a la mayor dosis empleada. Por vía intraperitoneal, la cantidad máxima de antiveneno que se utilizó fue 46 mg y por la vía subcutánea de 36.8 mg.

Para poder cuantificar el rescate por otras vías parenterales distintas a la intravenosa, se realizó una nueva serie de ensayos de rescate con Antivipmyn® retando con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub>. Al disminuir los daños causados por la cantidad de veneno administrado, aumentó la capacidad de rescate por estas vías. Cabe mencionar, que se probó que esta cantidad de veneno es suficiente para causar la muerte en el 100 % de los ratones.

En esta serie de experimentos de rescate, la DE<sub>50</sub> por vía intravenosa fue de 0.81 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> por vía intraperitoneal fue 5.7 mg/2DL<sub>50S.C.</sub>, en el rescate por vía subcutánea de 6.16 mg/2DL<sub>50S.C.</sub>. Cuando la dosis de reto disminuyó los daños causados por el veneno fueron menos severos y más lentos dando tiempo al antiveneno para actuar.

Por la vía intramuscular retando con 2DL<sub>50S.C.</sub> el rescate nuevamente fue parcial, administrando hasta 27.6 mg/2DL<sub>50S.C.</sub> de antiveneno. Por lo cual creemos que la absorción del antiveneno desde el músculo del ratón hasta el torrente sanguíneo es más bien ineficaz.

Vale la pena hacer notar que aún en los casos en los que no hubo rescate total, el antiveneno ocasionó un retraso en el tiempo de la aparición de síntomas y el de la muerte de los animales, por lo que suponemos que existe llegada del antiveneno al torrente sanguíneo, aunque esto fue parcial. Considerando que en los casos de envenenamiento por alacrán o serpientes el tiempo desde que ocurre el accidente hasta la aplicación del antiveneno puede ser la diferencia entre la vida y la muerte, su menor eficacia por vías parenterales distintas a la intravenosa, tiene gran relevancia dado que le brinda al paciente un lapso de tiempo mayor para acudir a recibir la atención adecuada, si no se tiene la posibilidad de administrar el antiveneno vía intravenosa.

## **10 CONCLUSIONES.**

- La letalidad del veneno de *C. limpidus* es similar cuando se administra de manera intravenosa o subcutánea, debido a que la dosis letal media subcutánea es tan sólo 1.5 veces mayor a la intravenosa, lo cual sugiere, que se absorbe rápidamente a torrente sanguíneo, de tal forma que las toxinas están disponibles para alcanzar su blanco.
- La letalidad del veneno de *C. atrox* es menor cuando se administra por vía intravenosa o subcutánea, dado que por vía subcutánea la cantidad necesaria para matar al 50 % de la población es tres veces mayor con respecto a la vía intravenosa.
- Los faboterápicos Alacramyn y Antivipmyn tienen alta capacidad de rescate por vía intravenosa, dado que su dosis efectiva media es similar a la determinada en ensayos de neutralización preincubando veneno-antiveneno.
- El daño en órganos y tejidos ocasionados por la toxicidad del veneno de *C. atrox* cuando se reta con el equivalente a 3DL<sub>50S.C.</sub>, disminuye la posibilidad del rescate. Por otra parte, cuando se reta con el equivalente a 2DL<sub>50S.C.</sub> el envenenamiento y los daños son menos severos, permitiendo que el antiveneno actúe con mayor eficacia.
- La capacidad de rescate en ratones, del Alacramyn® por distintas vías parenterales fue: I.V.>> I.P.>I.M. >S.C. y la del Antivipmyn® fue I.V. >> I.P. ≥ S.C > I.M.
- A pesar de que el rescate por las vías I.M., I.P. y S.C. es menor que por la vía intravenosa, retrasan significativamente el desarrollo del envenenamiento y el tiempo de muerte.
- El ratón, aparentemente no es el modelo animal más adecuado para probar la capacidad neutralizante de los faboterápicos por la vía intramuscular, debido a las limitaciones anatómicas que éste posee.

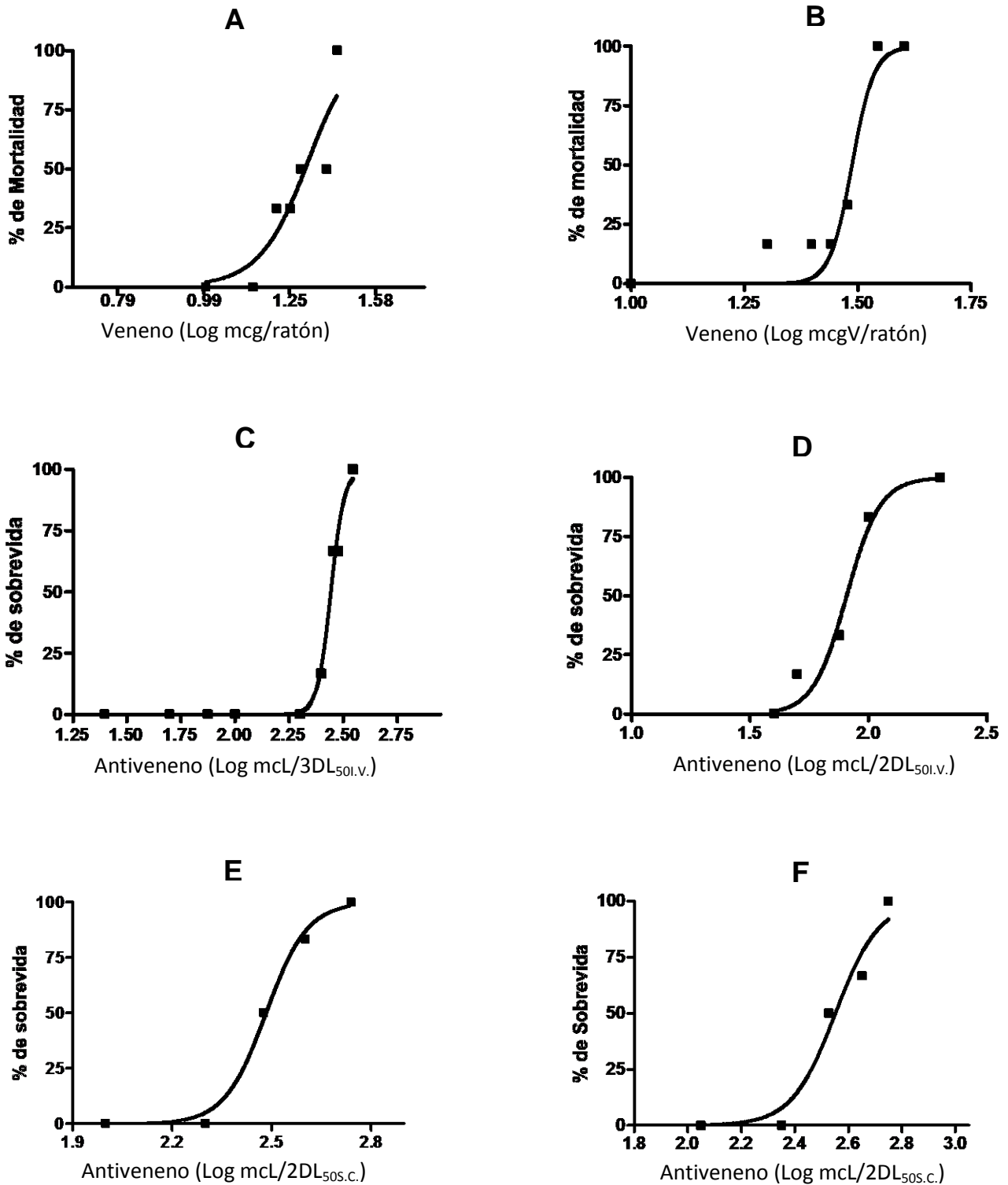
## 11 REFERENCIAS.

1. Bourée P, Frinot J, Fernot J, Morell G, Barrera R, Goyffon M. 2005. Scorpion stings: a public health problem in Morelos (Mexico). *Santé* (Montrouge France). 15:217-223.
2. Braud S, Cassian B, Wisner A. 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82:851-859.
3. Burke J y Dennis E. 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling. *Journal of lipid research* 50:237-242.
4. Calvete J, Fasoli E, Sanz L, Boschetti, Righetti G. 2009. Exploring the venom proteome of Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. *Journal of proteomic research* 8:3055-3067.
5. Campbell J A. y Lamar W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Volumen II. 1ª Edición. pp. 529-530 New York.
6. Caterall W. A, Cestéle Sandrine, Yarov-Yarovoy V, Yu F.H, Konoki K, Scheuer T. 2006. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49:124-141.
7. Chaves F, Loría G, Salazar A, Gutiérrez JM. 2003. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*: comparison between Fab and IgG. *Toxicon* 41:237-244.
8. Chippaux J.P y Goyffon M. 1997. Venoms antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36:823-846.
9. Ellis RM, Sprivulis PC, Jelineck GA, Banham ND, Wood SV, Wilkes GJ, Siegmund A, Roberts BL. 2005. A double-blind, randomized trial of intravenous versus intramuscular antivenom for red-back spider envenoming. *Emergency medicine Australasia* 17: 102-103.
10. Goodman y Gilman (Editores) 1996. Las bases de la farmacología. 9ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. México.
11. Graham M. 2006. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* 49:490-512.
12. Gurrola GB, Possani LD. 1995. Structural and functional features of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocker. *Biochemical and Molecular Biology International* 3:527-535.
13. Gutierrez JM, León G, Lomonte B. 2003 Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clinical pharmacokinetic* 42:721-741.
14. Gutierrez JM, Rucavado A. 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissues damage. *Biochimie* 82:841-850.
15. Gutman G, Chandy G, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo L, Robertson G, Rudy B, Sanguinetti M, Stuhmer W, Wang X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57:473-508.
16. Harvey AI, Marshall DL, Possani LD. 1992. Dendrotoxin-like effects of noxiustoxin. *Toxicon* 11:1497.
17. <http://www.redtox.org> Fecha de consulta: 27-Julio-2008

18. Isbister K, O'Leary M, Miller M, Brown S, Ramasamy S, James R, Schneider J. 2007. A comparison of serum antivenoms concentration after intravenous and intramuscular administration of redback (widow) spider antivenom. *British Journal of Clinical Pharmacology* 65:139-143.
19. Ismail M, 1994. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, 33(7): 825-858.
20. Janeway Ch A, Travers P, Waldport M, Shlomchik M. 2001. Immunobiology. 5a Edición, Capítulo 2 y 9. New York.
21. Joz'e Pungerc', Igor Kriz'. 2007. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon* 50:871-892.
22. Kini M, 2003 Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42:827-840.
23. Klauber M L. 1997. Rattlesnakes. Volumen II. 2ª Edición. pp. 807-808 London England.
24. McNally J, RPh, DABAT, Boesen K, PharmD, Boyer L, MD, FACMT. 2008. Toxicologic information resources for reptile envenomations. *Veterinary Clinics exotic animal practice* 11:389-401.
25. Meier Jürg and White Julian. 1995. Clinical Toxicology of Venoms and Poisons. Capítulos: 1, 18 y 24. New York.
26. Miller Christopher. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biology* 1(4): reviews 0004.1-0004.5
27. Panfolli I, Ravera S, Calzia D, Dazzi E, Gandolfo S, Morelli A. 2006. Inactivation of phospholipase A2 and metalloproteinase from *Crotalus atrox* venom by direct current. *Journal Biochemical Molecular Toxicology* 21:7-12.
28. Possani, L. D., Martin, B. M. and Svendsen, I. B. 1982. The primary structure of Noxiustoxin: a K<sup>+</sup> Channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Research Communications* 47:285-289.
29. Revelo M, Bambirra E, Ferreira A, Ribeiro C, Chávez-Olórtegui C. 1996. Body distribution of *Tytus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* 34:1119-1125.
30. Riviere G, Choumet V, Audebert F, Sabouraud A, Debray M, Scherrmann JM y Bon C. 1996. Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 281: 1-8.
31. Rodríguez de la Vega y Possani L. D. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolutions. *Toxicon* 46:831-844.
32. Rodríguez de la Vega y Possani L. D. 2006. Scorpion venom peptides. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Kastin A., San Diego Academic Press. Capítulo 51 pp.339-354.
33. Rodríguez de la Vega, Merino E, Becerril B, Possani L. 2003. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 4: 222-228.

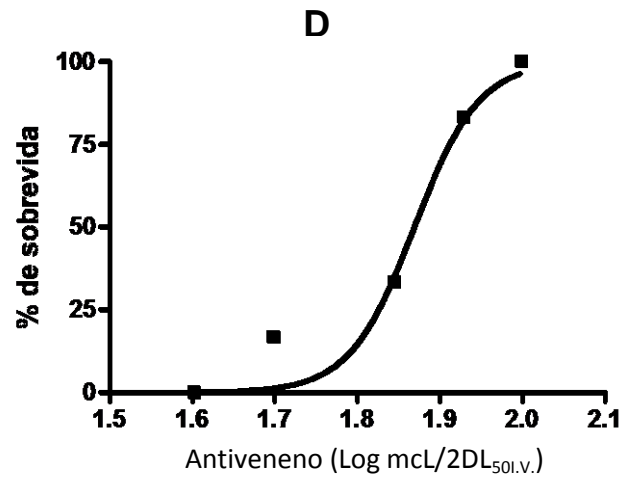
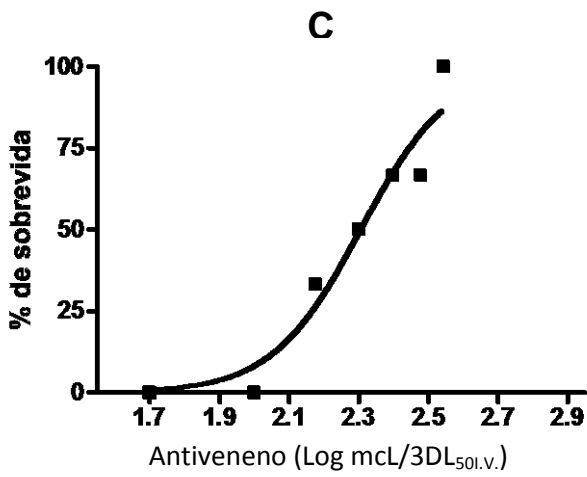
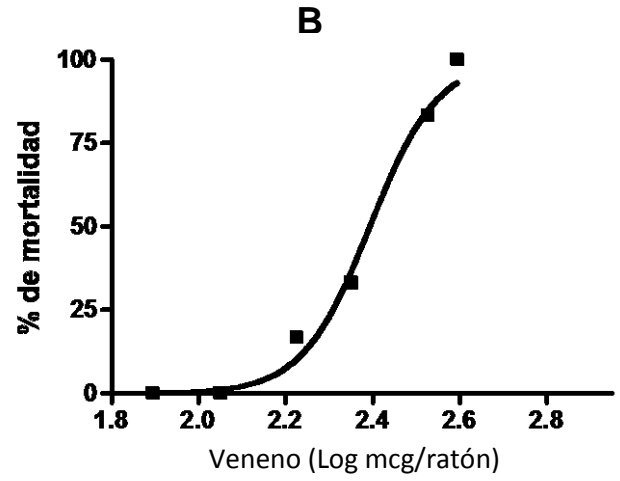
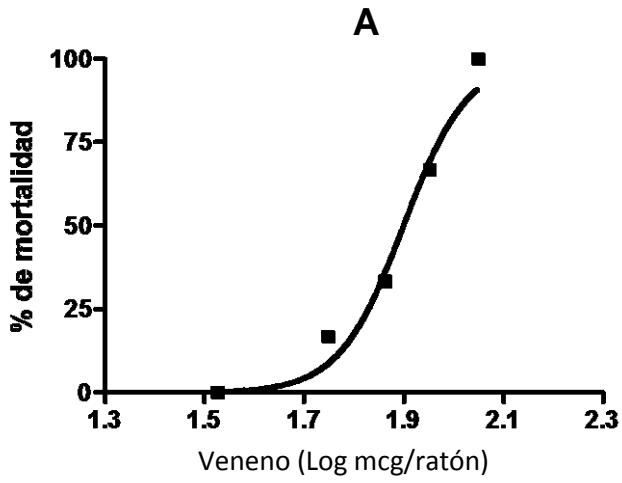
34. Saravia P, Rojas E, Escalante T, Arce V, Chaves E, Velásquez R, Lomonte B, Rojas G y Gutiérrez JM. 2001. The venom *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39:401-405.
35. Schunk MK, Macallum GE. 2005. Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR Journal* 46(3): 241-257.
36. Seifert S y Boyer L. Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. 2001. *Annals of emergency medicine* 37:2
37. Shargel L, Andrew Yu. 1993. Applied Biofarmaceutics Pharmacokinetics, cuarta edición. Appleton and Lange Stamford Connecticut. pp 109, 155-159.
38. Shimokawa K, Shannon J, Li-Guo J, Fox W. 1997. Sequence and Biological Activity of Crotocollastatin C: A Disintegrin-Like/Cysteine-Rich Two-Domain Protein from *Crotalus atrox* Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 343:35-43.
39. Siegel, George J, Bernard W, Albers, Wayne R, Fisher, Stephen K, Uhler, Michael D. 1999. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
40. Vázquez H, Chávez-Haro A, García-Ubbelohde, Paniagua-Solís J, Alagón A, Sevcik C. Pharmacokinetics of a F(ab')<sub>2</sub> scorpion antivenom administered intramuscularly in healthy volunteers. 2010. *Journal international of immunopharmacology* (in press)
41. Velasco M A. 2000. Farmacología general 2ª Edición. Capítulo 2. Barcelona España.
42. Velázquez. Farmacología General y Clínica. 2004. 17ª Edición. Eds. Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. pp 427-441.
43. Weinstein S, Dart R, Staples A, White J. 2009. Envenomations: an overview of clinical toxicology for the primary care physician. *American Family Physician* 80(8): 793-802.
44. Xiao-Yan Du, Derek S, Wen-Hui L, Yun Zhang. 2006. Blood cells as targets of snakes toxins. *Blood Cells Molecules and Diseases* 3.

## APÉNDICE 1

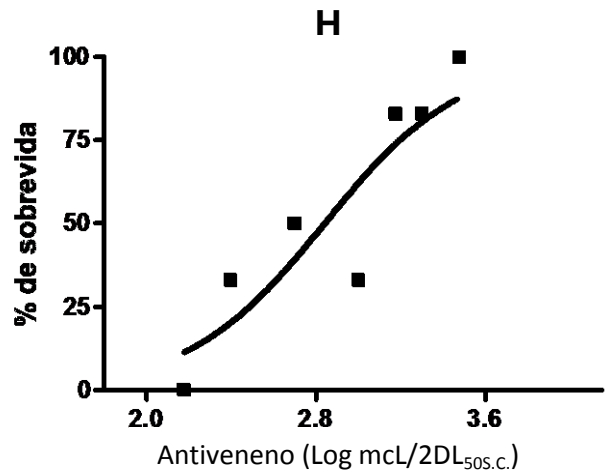
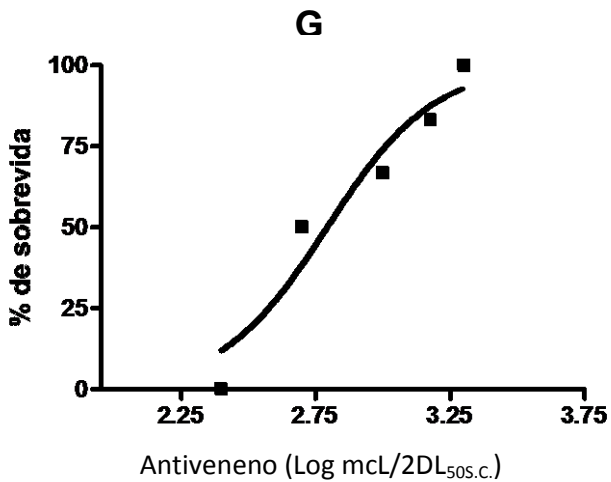
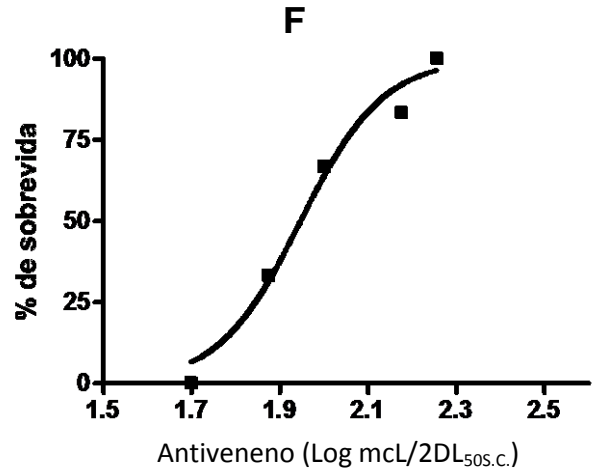
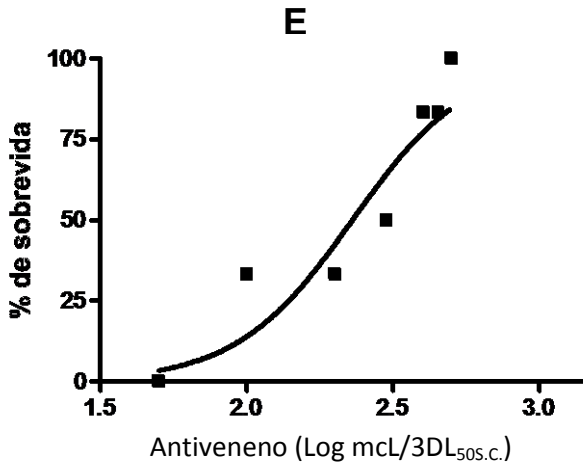


Las figuras A y B, son las curvas dosis-respuesta de las DL<sub>50s</sub> del veneno de *C. limpidus* por las vías I.V. y S.C. respectivamente; las figuras B y C, son las curvas de las DE<sub>50s</sub> *in vitro* preincubando el AV con dos y tres DL<sub>50I.V.</sub> respectivamente; y las figuras E y F, son las curvas de las DE<sub>50s</sub> en los ensayos de rescate Alacramyn® vs *C. limpidus* por las vías I.V e I. P. respectivamente.

## APÉNDICE 2







Las figuras A y B, son las curvas dosis-respuesta de las DL<sub>50s</sub> del veneno *C. atrox* por las vías I.V. y S.C. respectivamente; las figuras B y C, son las curvas de las DE<sub>50s</sub> *in vitro* preincubando el AV con dos y tres DL<sub>50i.v.</sub> respectivamente; la figura E, es la curva del rescate I.V. con reto de 3DL<sub>50</sub>; y las curvas F, G, y H son, en ese orden, las curvas de las DE<sub>50s</sub> en los ensayos de rescate Alacramyn® vs *C. limpidus* por las vías I.V e I. P. y S.C. respectivamente.