



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Participación del sistema linfático  
en la absorción y distribución del veneno de *Micrurus fulvius***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Dayanira Sheira Paniagua Meza

TUTOR PRINCIPAL

[Dr. Alejandro Alagón Cano IBT-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE  
ADSCRIPCIÓN

[Dr. Lourival Domingos Possani Postay IBT-UNAM](#)

[Dr. José Héctor Morales Bárcenas Doctorado en Ciencias Bioquímicas](#)

MÉXICO, D. F., 2014



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón Cano.

Se agradece el apoyo financiero otorgado por DGAPA a través del proyecto IN205214, a CONACyT a través del proyecto No. C382-08 y del proyecto INFR-2014 No. 224494, y a la Universidad de Arizona a través de proyecto P-346 para la realización del presente trabajo. También se agradece a CONACyT por la beca No. 172601 otorgada para estudios de posgrado y al Tecnológico de Monterrey a través del premio Luis Elizondo 2014, por haber proporcionado el apoyo económico para la escritura de mi tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por su instrucción académica, por permitirme ser parte de su grupo y por la confianza y libertad brindada en la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Héctor Morales Bárcenas  
Dr. Domingos Lourival Possani Postay

por sus observaciones y comentarios que contribuyeron en la realización y enriquecimiento del proyecto.

A los miembros del Jurado:

Dr. Baltazar Becerril Luján  
Dra. Angélica Meneses Acosta  
Dr. Luis Alberto Medina  
Dr. Lorenzo Segovia Forcella  
Dra. Liliana Pardo López

Por su tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo, por sus observaciones y comentarios que contribuyeron en la mejora de esta tesis.

Al Venom Immunochemistry, Pharmacology and Emergency Response (VIPER) Institute y Lymphology Laboratories de la Universidad de Arizona, por su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Camilo Romero Núñez y la M.V.Z. Lucia Jiménez Martínez, la M en C. Irene Vergara Bahena, la M. en C. Arlene Calderón y la M en C. Melisa Benard por su apoyo en las intervenciones quirúrgicas y en la toma de muestras.

Al rancho Ojo de Agua por las facilidades otorgadas para la realización de algunos experimentos.

Al M. en C. Alejandro Olvera, al Biol. Héctor Cardozo, al Biol. Felipe Olvera, a Angélica Linares y a Ricardo Mondragón, por su apoyo técnico y logístico.

Al Ing. Jalil Saab Hassanille, al Lic. José Antonio Bolaños Guillen y a Gloria Villa Herrera. de la unidad de docencia, por su apoyo administrativo.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1	VENENOS DE SERPIENTES	4
2.2	ABSORCIÓN SUBCUTÁNEA	7
2.2.1	TEJIDO SUBCUTÁNEO	8
2.2.2	SISTEMA LINFÁTICO	10
2.2.3	ABSORCIÓN DIFERENCIAL	12
2.2.4	MODELO DE ESTUDIO	13
2.3	DISTRIBUCIÓN	14
2.3.1	ELIMINACIÓN	14
2.3.2	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	17
2.4	FARMACOCINÉTICA DE VENENOS	17
2.4.1	COMPONENTES DEL VENENO Y SU ABSORCIÓN	18
2.5	<i>MICRURUS FULVIUS</i> COMO MODELO	19
2.5.1	<i>MICRURUS FULVIUS</i>	19
2.5.2	VENENO Y MECANISMO DE ACCIÓN	21
2.6	ANTIVENENOS	21
2.6.1	FARMACOCINÉTICA DE ANTIVENENOS (AV)	23
2.7	DISPARIDAD FARMACOCINÉTICA Y RECURRENCIA	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
5.1	OBJETIVO GENERAL	27
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES	27
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
6.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	28
6.2	VENENO	29
6.3	ANTIVENENOS	29
6.4	CIRUGÍA	30
6.4.1	PREQUIRÚRGICO	30
6.4.2	ANESTESIA	30
6.4.3	REGISTRO DE SIGNOS VITALES DURANTE LA ANESTESIA	31
6.4.4	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	31
6.5	FARMACOCINÉTICA DEL VENENO ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA	32
6.6	FARMACOCINÉTICA DEL VENENO ADMINISTRADO POR VÍA SUBCUTÁNEA	32
6.7	ABSORCIÓN LINFÁTICA	32
6.8	EFFECTO DEL ANTIVENENO EN LA FARMACOCINÉTICA DE VENENO	33
6.9	FARMACOCINÉTICA DEL ANTIVENENO	33
6.10	COLECTA DE MUESTRAS	34
6.10.1	SANGRE	34

6.10.2	LINFA.....	36
6.10.3	PIEL.....	37
6.10.4	ÓRGANOS .....	37
<b>6.11</b>	<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....</b>	<b>37</b>
<b>6.12</b>	<b>DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VENENO.....</b>	<b>38</b>
<b>6.13</b>	<b>DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ANTIVENENO .....</b>	<b>39</b>
<b>6.14</b>	<b>ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTAMENTAL .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>7.1</b>	<b>CINÉTICA IV DEL VENENO DE MICRURUS FULVIUS.....</b>	<b>43</b>
<b>7.2</b>	<b>ABSORCIÓN DEL VENENO ADMINISTRADO VÍA SC.....</b>	<b>45</b>
<b>7.3</b>	<b>PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO EN EL PROCESO DE ABSORCIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>7.4</b>	<b>ACUMULACIÓN DEL VENENO EN ÓRGANOS Y EN EL SITIO DE INOCULACIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>7.5</b>	<b>MODIFICACIÓN DE LA CINÉTICA DEL VENENO EN PRESENCIA DE AV .....</b>	<b>53</b>
<b>7.6</b>	<b>NEUTRALIZACIÓN DEL VENENO ABSORBIDO POR LINFA .....</b>	<b>55</b>
<b>7.7</b>	<b>NEUTRALIZACIÓN DEL VENENO EN EL SITIO DE INOCULACIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>7.8</b>	<b>FARMACOCINÉTICA DE AV .....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vida media en espacio subcutáneo .....	8
Figura 2. Linfáticos iniciales .....	10
Figura 3. Linfagiones. ....	11
Figura 4. Permeabilidad de capilares .....	13
Figura 5. Inmunoglobulina G.....	22
Figura 6. Diseño experimental .....	29
Figura 7. FC de veneno administrado vía I.V.....	43
Figura 8. FC de veneno en suero administrado vía SC .....	46
Figura 9. Influencia de la absorción linfática en la FC.....	48
Figura 10. PC de veneno en linfa y suero administrado vía SC .....	49
Figura 11. Veneno en órganos y sitio de inoculación de grupos envenenados.....	52
Figura 12. PC de veneno y AV en suero grupo CSS-R .....	54
Figura 13. Cinética de veneno y AV en suero del grupo CSL-R.....	56
Figura 14. FC de veneno y AV en linfa del grupo CSL-R .....	57
Figura 15. Comparativo de FC de veneno en linfa con y sin AV .....	58
Figura 16. Veneno y AV en el sitio de inoculación y en órganos.....	60
Figura 17. FC del AV administrado vía IV. ....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales toxinas de venenos de serpientes .....	5
Tabla 2. Mecanismo de extravasación de proteínas. ....	6
Tabla 3. Mecanismo de eliminación de proteínas .....	15
Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos de AV .....	24
Tabla 5. Dosis de AV administrada a cada borrego. ....	34
Tabla 6. Esquema de muestreo de sangre para los grupos CIS, CSS y CSL.....	35
Tabla 7. Esquema de muestreo de sangre para el grupo CSS-R.....	35
Tabla 8. Esquema de muestreo de sangre para el grupo CSL-R.....	36
Tabla 9. Esquema de muestreo de sangre para el grupo AvIS.....	36
Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos <sup>a</sup> del veneno administrado vía IV y SC.....	50
Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos <sup>a</sup> del veneno y AV en los grupos “rescate” .....	59
Tabla 12. Comparativo de los parámetros FC de F(ab') <sub>2</sub> .....	63

## ABREVIATURAS

AV	Antiveneno
AUC	Área bajo la curva
AUMC	Área bajo la curva de primer momento
C(s)	Concentración sérica
CIS	Coral Intravenoso Sangre
CL	Depuración
CSL	Coral Subcutáneo Linfa
CSL-R	Coral Subcutáneo Linfa – Rescate
C <sub>Smax</sub>	Concentración sérica máxima
CSS	Coral Subcutáneo Sangre
CSS-R	Coral Subcutáneo Sangre – Rescate
C <sub>z</sub>	Concentración al final del experimento
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
F	Biodisponibilidad
F(ab') <sub>2</sub>	Fragmento de unión a antígeno divalente
Fab	Fragmento de unión a antígeno
FC	Farmacocinética
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
k	Constante de decaimiento
MAT	Tiempo promedio de absorción
MRT	Tiempo promedio de retención
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasas tipo A <sub>2</sub>
SC	Subcutáneo
SVMP	Metaloproteasa de veneno de serpientes
t	Tiempo
t <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida media
Vd	Volumen de distribución inicial
V <sub>ss</sub>	Volumen de distribución en estado estacionario
λ <sub>z</sub>	Constante de decaimiento al final del experimento



## RESUMEN

A pesar de la bibliografía que existe sobre la caracterización bioquímica de venenos de serpientes, casos clínicos e investigación y desarrollo de antivenenos (AVs) para su tratamiento, la evolución de la sintomatología y gravedad del envenenamiento siguen siendo impredecibles y por lo tanto difíciles de tratar. Algunos autores plantean la disparidad farmacocinética (FC) entre veneno y AV como causa de recurrencia de síntomas. Sin embargo, la FC de venenos ha sido poco estudiada y se desconocen los procesos involucrados, así como su repercusión en el envenenamiento. Se sabe que el sistema linfático puede tener una participación importante en la absorción de proteínas administradas vía subcutánea (SC), lo que impacta la biodisponibilidad y tiempo de residencia; sin embargo, su participación depende de distintos factores y propiedades de la proteína en cuestión.

En este trabajo se analizó por primera vez, la contribución del sistema linfático en el envenenamiento ofídico y su impacto en la neutralización con el AV. Para ello se utilizó veneno de la serpiente de coral *Micrurus fulvius*, por ser un veneno relativamente simple, pero altamente tóxico.

Las FCs se realizaron en un modelo ovino con canulación linfática central. Se organizaron distintos grupos experimentales en los que se determinaron las FC del veneno por vía intravenosa (IV) y SC, con y sin canulación del ducto torácico y drenaje linfático. También se analizó como se modifica dicha FC, cuando el AV correspondiente (F(ab')<sub>2</sub>) se administra vía IV, dos horas después de iniciado el envenenamiento. Finalmente, se evaluó si la FC del AV permite neutralizar el veneno que todavía no se absorbe y que se encuentra en linfa o en el sitio de inoculación. Para ello, se tomaron muestras de suero y linfa a distintos tiempos durante 6 horas, y muestras *post mortem* de órganos y del sitio de inoculación. Las concentraciones de veneno y AV en las muestras se determinaron por ensayos de ELISA y se hizo un análisis no compartamental de las FCs obtenidas. Los parámetros FCs del veneno administrado vía IV sugieren que el veneno no tiene afinidad importante por algún tejido o proteína endógena, con un tiempo de vida media de 25 minutos. El análisis de

la FC SC mostró una biodisponibilidad (F) del 60% de la dosis administrada, y un comportamiento estacionario, lo que indica que la absorción es el proceso limitante. Al analizar la absorción linfática, se determinó que el 25% del total de la dosis absorbida (69% de la dosis administrada) se absorbió por vía linfática, y mostró que aunque la absorción linfática no impacta las concentraciones máximas alcanzadas en suero, sí determina el estado estacionario de la cinética. No se encontraron niveles importantes de veneno en orina u órganos. Sin embargo, en la zona donde se administró el veneno, se encontraron concentraciones significativamente altas en comparación con la región contralateral. Esto indica que el sitio de inoculación funciona como un depósito desde donde el veneno se absorbe lentamente. Al administrar el AV vía IV, las concentraciones de veneno en suero cayeron a valores indetectables por ELISA. A la par que el AV se detectaba e incrementaba su concentración en linfa, las concentraciones de veneno decrecieron paulatinamente. Sin embargo, en el sitio de inoculación las concentraciones de veneno se mantuvieron altas, aunque sí se detectó presencia de AV. Lo anterior sugiere que el veneno remanente en el sitio de inoculación no es neutralizado y se sigue absorbiendo hasta llegar a linfa o sangre, donde es neutralizado por el AV disponible. Finalmente se analizó la FC del AV administrado vía IV y se demostró que el AV tiene la capacidad de mantenerse en circulación por al menos 95 horas en el modelo animal utilizado en este trabajo.

Este trabajo demuestra por primera vez, que el sistema linfático tiene un papel relevante en la absorción del veneno, impactando tiempo de residencia y biodisponibilidad. También prueba que la neutralización por AV ocurre principalmente en sangre y en menor medida en sistema linfático. También demuestra que la biodistribución del AV es limitada y que la neutralización que se alcanza en el sitio de inoculación es pobre, lo que permite que el veneno activo se mantenga en el organismo por mayor tiempo. Por lo que el AV debe de estar en exceso para que anticuerpos neutralizantes disponibles se mantengan en circulación durante el tiempo que el veneno es absorbido.

## ABSTRACT

Despite the knowledge that has been developed around snake venoms biochemistry, clinical cases, research and development of antivenoms (AV) for treatment; the symptomatology evolution and severity of envenomation are still unpredictable and thus hard to treat. Some authors proposed a gap between venom and AV pharmacokinetics (PK) as cause of envenomation recurrence.

Venom pharmacokinetics information is scarce; mechanisms involved and impact in envenomation are poorly understood.

The lymphatic system has been analyzed as a contributor in subcutaneous PK of proteins, which impacts in bioavailability and residence time. Lymphatic absorption depends of factors and properties of each protein.

For the first time, the contribution of the lymphatic system in snake envenomation and the relationship with neutralization process has been analyzed.

The venom used for this purpose has been coral snake *Micrurus fulvius* venom, because simplicity of composition and high lethality.

The PK experiments had been carried out using a central lymph-cannulated sheep model. PK profile for *Micrurus fulvius* venom was established after intravenous (IV) and subcutaneous (SC) administration with and without thoracic duct cannulation and lymphatic drainage. In order to evaluate the PK profile modification by F(ab')<sub>2</sub> AV, this was administered IV two hours after envenomation. This allowed analyzing if AV administered by this route was able to reach and neutralize venom that remains in the inoculation site and lymph. Venom concentration in serum and lymph were determined by a sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in samples collected over a 6-hour period and in tissues harvested at the end of the experiment. PK parameters were determined by a non-compartmental analysis. The venom IV PK analysis suggests non-affinity for tissues or proteins with half-life value of 25 minutes. After SC administration, only 60% of administered dose was accounted for in blood showing a steady state behavior maintained by a slow absorption process. Twenty five percent of total absorption (69% of the dose administered), was carried out through lymphatic system. The PK profile shows that lymphatic absorption does

not impact venom concentration but determines the steady state behavior. Negligible levels of venom were detected in organs or urine, whereas very high levels were detected at the inoculation point as compared with contralateral site. This implies that inoculation site function as a depot, where the venom is retained and slowly absorbed. When AV was administered IV after 2 hours of envenomation, venom levels in serum fell down to undetectable. Venom levels in lymph decayed slowly, while AV was reaching this fluid. At the inoculation site, the venom levels remained high, although AV was detectable. These results suggest that venom retained at the inoculation site was not neutralized by AV, and continued being absorbed until it reached lymph or blood, where it was neutralized with AV kept available in these fluids. Finally, we analyzed IV PK for AV, and demonstrated that AV can be kept circulating systemically at least 95 h in this animal model.

This investigation proves for the first time, that lymphatic system has a relevant role in venom absorption, which impacts residence time and bioavailability. Although proves that AV biodistribution is limited and neutralization in the inoculation site is poor. This allows active venom stays in the body for longer time. AV must be in excess to keep neutralizing antibodies available for a match in residence time with venom.

## 1 INTRODUCCIÓN

Los accidentes ofídicos son un problema de salud en los 5 continentes, sobre todo para países en desarrollo económico y con climas subtropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima 1,841,000 envenenamientos y 94,000 muertes [WHO, 2014].

Los envenenamientos se manifiestan por la toxicidad que algunos componentes del veneno ejercen sobre el organismo. Los venenos son una mezcla compleja de sustancias, principalmente proteínas, que ejercen una acción farmacológica [Chippaux, 2006], entre las que destacan neurotoxicidad, citotoxicidad, actividad hemorrágica y/o necrótica [Chippaux and Goyffon, 1998]. La presencia y concentración de cada componente en el veneno varía entre especies, y también depende del sexo, estado fisiológico y condiciones ambientales en las que se desarrolle cada espécimen [Chippaux, 2006]. Debido a ello, gran parte de la investigación en el área se ha centrado en caracterizar los venenos, medir su toxicidad y describir su mecanismo de acción. Sin embargo, los factores que influyen en la gravedad del envenenamiento no sólo incluyen la composición del veneno y la cantidad inyectada, también su liberación, la edad de la víctima, su talla y estado de salud [Gold *et al.*, 2004].

El único tratamiento efectivo para neutralizar los componentes tóxicos del veneno y tratar el envenenamiento, es el uso del AV correspondiente [Chippaux, 2006]. Este tratamiento consiste en la administración en bolo intravenoso (IV) de anticuerpos neutralizantes (IgG) o sus fragmentos (Fab or F(ab')<sub>2</sub>) purificados de plasma de animales hiperinmunizados (generalmente caballos) con el veneno correspondiente o con una mezcla [Chippaux, 2006]. La FC de cada tipo de AV ya ha sido evaluada experimentalmente en distintas especies de animales o personas voluntarias [Ismail y Abd-Elsalam, 1998; Krifi *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 1994; Pepin *et al.*, 1995; Rivière *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 2005, 2010a, 2010b], pero la dosificación, ruta de administración y el tiempo de terapia siguen estando en debate, por lo que el tratamiento es empírico y depende de la capacidad médica, las circunstancias de la mordedura y la sintomatología local y/o sistémica [Chippaux y Goyffon, 1998].

En algunos casos, después de administrar el AV se han observado recurrencias locales en el envenenamiento, tales como aumento en el daño tisular, ó sistémicas como la recurrencia coagulopática, lo que provoca riesgo de hemorragia. Estas recurrencias se han observado con distintos venenos y parecen ser el resultado de una disparidad FC entre el veneno y AV [Seifert y Boyer, 2001; Bush *et al.*, 2013; Boyer *et al.*, 2013]. La ausencia de protocolos adecuados para el tratamiento con AVs es consecuencia de la falta de conocimiento sobre la FC de venenos [Audebert *et al.*, 1994]. Existen pocos reportes sobre el tema, algunos de ellos analizan la FC a partir de la administración IV, mostrando que el veneno se distribuye muy rápido en el organismo y se elimina de manera lineal [Audebert *et al.*, 1994]. Pero esta vía de administración no imita la inyección del veneno después de una mordedura. La administración SC o intramuscular (I.M.) son más representativas del accidente ofídico, causan síndromes más complejos, y modifican la toxicidad [Chippaux, 2006]. El fenómeno de recurrencia se ha asociado con el proceso de absorción desde el sitio de inoculación, que se cree, funciona como un depósito a partir de donde se absorbe el veneno [Theakson, 1997].

La absorción SC se ha estudiado con proteínas de interés terapéutico [Porter y Charman, 2000; Richter y Jacobsen, 2014], pero nunca para venenos. Con base en esos estudios, se sabe que la absorción es un proceso limitante que impacta el tiempo de residencia, limita la FC e incrementa la exposición sistémica [Richter y Jacobsen, 2014]. Los mecanismos involucrados en la absorción SC todavía no se conocen del todo, sin embargo se sabe que el sistema linfático tiene un papel fundamental en estos procesos [Porter y Charman, 2000; Richter y Jacobsen, 2014]; y uno de los factores determinantes es la relación directa con el tamaño molecular [Supersaxo *et al.*, 1990], lo que impacta el perfil FC.

Después de que las proteínas son liberadas en el espacio intersticial, procesos difusivos y convectivos tienen lugar a través de la matriz extracelular, hasta que alcanzan la circulación sistémica por absorción directa y/o a través del sistema linfático [Richter y Jacobsen, 2014]. La absorción del veneno a través del sistema linfático fue sugerida desde 1940 [Fidler *et al.*, 1940; Barnes y Trueta, 1941] pero nunca ha sido explorada o demostrada.

Considerando que la absorción por sistema linfático es uno de los procesos involucrados en la FC de proteínas administradas vía SC, resulta fundamental aislarlo de otras variables para el estudio sistemático de su participación durante el envenenamiento. Esta situación se vuelve complicada cuando se habla de venenos de serpientes, ya que distintos componentes presentes en varios de los venenos, como la hialuronidasa, metaloproteasas y/o miotoxinas pueden influir en la absorción SC por su acción farmacológica, modificando la integridad de la matriz extracelular, causando edema, rompimiento del endotelio vascular o interrumpiendo el flujo linfático [Girish *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2005; Mora *et al.*, 2008].

Para analizar la participación del sistema linfático en un accidente ofídico, el veneno de la serpiente de coral *Micrurus fulvius* es un buen modelo, ya que es uno de los venenos más simples en composición, aun cuando es de los más tóxicos entre las serpientes de coral [Roze, 1996]. *Micrurus fulvius* es una serpiente venenosa endémica de Estados Unidos [Sánchez *et al.*, 2008]. La toxicidad de su veneno está dada por neurotoxinas presinápticas que impiden la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular, causando una parálisis progresiva que puede evolucionar hasta un paro respiratorio [Vergara *et al.*, 2014]. Los síntomas pueden aparecer hasta 18 horas después de la mordida [Kitchens and Van Mierop, 1987], lo que sugiere una FC compleja. El envenenamiento por *Micrurus fulvius* es raro, sin embargo se puede asociar con morbilidad significativa, que incluye falla respiratoria con intubación endotraqueal, ventilación mecánica y largas estadias en la unidad de cuidados intensivos y en casos no tratados se puede presentar la muerte [Wood *et al.*, 2013].

El uso de NACSAV® (North American Coral Snake Antivenin), el único AV contra *Micrurus fulvius* aprobado por la FDA, prevenía de manera eficiente la neurotoxicidad en los pacientes envenenados, sin embargo, su producción fue discontinuada en el 2003 y los últimos lotes disponibles expiraron en abril de 2014 [Wood *et al.*, 2013]. Una alternativa para tratar el envenenamiento por *Micrurus fulvius* es el AV mexicano Coralmyn® [Wisniewski *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2008]. Su eficiencia no está probada ante la FDA, por lo que su uso en E.U. no está permitido. Actualmente distintos AVs siguen en fase de evaluación para contender con esta crisis.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Venenos de serpientes

Los venenos de serpientes son una mezcla compleja de proteínas. Algunas de ellas son proteínas con baja toxicidad, mientras que otras ejercen una acción farmacológica importante y diversa, lo que genera un síndrome de envenenamiento muy complejo [Chippaux, 2006].

La composición de venenos varía entre familias de serpientes y esta diferencia es muy grande. Mientras que los venenos de elápidos son mayormente neurotóxicos, los venenos de vipéridos tienen gran cantidad de enzimas que actúan principalmente sobre tejido sanguíneo y muscular. Sin embargo, la diferencia no sólo se da entre familias, también existe diferencia entre géneros e incluso entre especies y subespecies [Chippaux, 2006]. También se ha visto que la composición del veneno puede variar entre sexos de la misma especie o en el mismo individuo, dependiendo de su edad y condiciones ambientales en las que se desarrolle [Chippaux, 2006]. Aunado al cambio en la composición del veneno, la proporción de las toxinas presentes también puede cambiar [Chippaux, 2006].

La variabilidad del veneno, las condiciones de la mordida, el estado de salud de la víctima y el tiempo entre la mordedura y el tratamiento, pueden ser la causa de que diversos estudios clínicos muestren variabilidad en la sintomatología del envenenamiento, causada por la misma especie [Chippaux, 2006].

En la Tabla 1 se muestran las principales toxinas encontradas en el veneno de distintas serpientes, su peso molecular y su actividad farmacológica. Con ello se pretende ilustrar la complejidad tanto de los venenos, como del síndrome de envenenamiento.



Tabla 1. Principales toxinas de venenos de serpientes

Familia proteica	Mecanismo de acción	Peso molecular	Efecto farmacológico
Fosfolipasas A <sub>2</sub>	Hidrolisis de fosfolípidos de membranas y formación de productos causantes de lisis celular.	8 -36 kDa	Hemólisis, citotoxicidad ó neurotoxicidad
Acetilcolinesterasas	Hidrólisis de acetilcolina.	126 kDa	neurotoxicidad
Fosfoesterasas	Hidrólisis de DNA y RNA.		
L-amino-ácido-oxidasa	Desaminación y oxidación de aminoácidos	85-153 kDa	Toxicidad despreciable
Hialuronidasa	Hidrólisis de ácido hialurónico y/o sulfato condritina.		Factor de dispersión
Serin-proteasas	Estructura similar a la cadena B de la trombina, actividad fibrinolítica y/o fibrinogenolíticas, activan protrombina o proteína C.	20-100 kDa	Coagulopatías
Metaloproteasas	Actividad fibrinolítica, fibrinogenolítica, activación del factor X o protrombina, degradación de endotelio vascular.	20-100 kDa	Hemorragias, coagulopatías
Toxinas de tres dedos (tipo curare)	Afinidad por el receptor nicotínico, bloqueo de la contracción muscular.	7-8 kDa	Neurotoxicidad
Toxinas de tres dedos (tipo muscarínico)	Afinidad por el receptor muscarínico.	7.5 kDa	Neurotoxicidad
Vipoxina	Afinidad por receptores adrenérgicos.	13 kDa	
Toxinas de tres dedos (Cardiotoxinas)	Despolarización irreversible de la membrana celular.	7-7.5 kDa	Cardiotoxicidad
Dendrotoxinas	Bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje, aumento en la liberación de acetilcolina.	6-7 kDa	Neurotoxicidad
Fasciculinas	Inhibición de la colinesterasa.	7 kDa	Neurotoxicidad
Miotoxinas	Unión a los canales iónicos de las células musculares.	5 kDa	Necrosis
Sarafotoxinas	Su mecanismo es similar al de las endotelinas.	2.5 kDa	vasodilatación
Desintegrinas	Inhibición de integrinas, proteínas transmembranales que permiten la trasferencia de mensajeros extracelulares al citoplasma	5-15 kDa	
Agregoserpentina	Acción sobre plaquetas y trombocitos. Enmascaramiento de los sitios efectores de la membrana plasmática o estimulación de la degranulación de los trombocitos	20-80 kDa	Coagulopatías
trombolectinas		26-30 kDa	
Mambina		7 kDa	

Adaptado de Chippaux, 2006.

Tras la mordedura, el veneno es inoculado en la víctima y las proteínas que lo componen comienzan un proceso de absorción hasta circulación sistémica. Este proceso se da por el sistema venoso, que reabsorbe el fluido intersticial hacia sistema circulatorio, gracias a que tiene una presión hidrostática menor [Shargel *et al.*, 2005]. Sin embargo, queda un exceso de fluido en el espacio intersticial que es absorbido por el sistema linfático [Aukland y Reed, 1993]. Una vez en circulación sistémica, su concentración se homogeniza rápidamente, gracias a un gasto cardiaco promedio de 5.5 L/min en reposo [Shargel *et al.*, 2005]. Ya en circulación sistémica, las proteínas se distribuyen en el organismo y llegan a su sitio de acción. La distribución sucede gracias al intercambio trasvascular de solutos que se conoce como extravasación [Takakura *et al.*, 1998; Shargel *et al.*, 2005]. Este proceso se da en las arterias, que como encargadas de llevar sangre a los tejidos, liberan el fluido en el espacio intersticial. La extravasación se da por difusión pasiva (gradiente de concentración osmótica) y por gradiente de presión hidrostática. Ambas fuerzas son conocidas como fuerzas de Starling [Swartz, 2001], y dependen la irrigación de cada órgano y de la permeabilidad de los capilares sanguíneos [Takakura *et al.*, 1998; Shargel *et al.*, 2005]. En la Tabla 2 se muestran los mecanismos de extravasación más comunes para proteínas, en función de la permeabilidad del endotelio capilar [Vugmeyster *et al.*, 2012].

<b>Endotelio capilar</b>	<b>Barrera/mecanismo de transporte</b>	<b>Tamaño de corte</b>	<b>Tejidos</b>
Continuo (no frenestrado)	Membrana de lámina basal sostenida por colágeno	50 – 110 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Músculo liso</li> <li>• Sistema nervioso central</li> <li>• Hueso</li> <li>• Piel</li> <li>• Músculo cardiaco</li> <li>• Pulmones</li> <li>• Membranas subcutáneas</li> <li>• Mucosas</li> </ul>
Fenestrado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poros grandes</li> </ul>	50 – 800 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riñones (glomérulo)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenestraciones abiertas</li> <li>• Uniones celulares</li> <li>• Lámina basal</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vellosidades intestinales</li> <li>• Tejido sinovial</li> <li>• Glándulas endocrinas</li> <li>• Plexo coroideo (cerebro)</li> </ul>
Discontinuo (sinusoidal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenestraciones</li> <li>• Pinocitosis</li> </ul>	1,000 – 10,000 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hígado</li> <li>• Bazo</li> <li>• Médula ósea</li> <li>• Vénulas postcapilares de nódulos linfáticos</li> </ul>

[Vuymeister et al., 2012]

Finalmente las proteínas son eliminadas de manera irreversible principalmente por metabolismo [Rowland y Tozer, 1995].

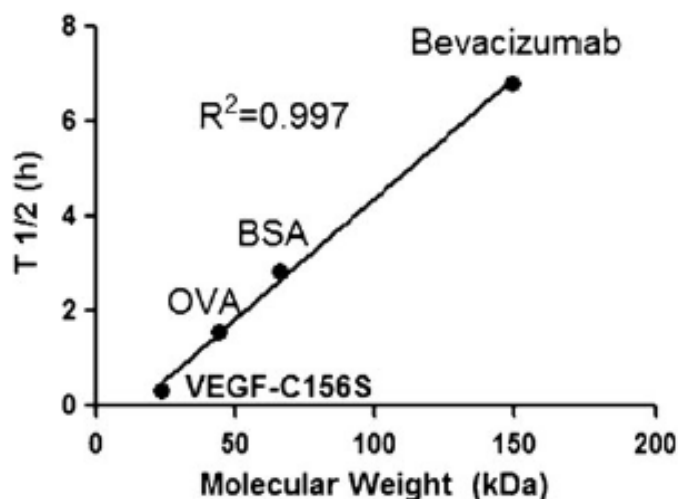
Cada uno de estos procesos está dado por distintos mecanismos que repercuten directamente en la acción farmacológica y se describen a continuación.

## 2.2 Absorción subcutánea

A pesar del extenso uso de esta vía de administración, el mecanismo exacto detrás de la absorción SC de proteínas es todavía desconocido, por lo que su comportamiento cinético sigue siendo impredecible [Kagan, 2014].

La administración SC involucra un proceso de absorción lento, que impacta el tiempo de residencia en el organismo, limita la FC y aumenta el tiempo de exposición sistémica [Richter y Jacobsen, 2014]. Se ha observado que el porcentaje de la dosis que llega a circulación sistémica (biodisponibilidad) suele ser incompleto, con una variación importante entre especies. La causa de estas variaciones no se conoce, sin embargo se cree que dependen de catabolismo pre-sistémico, drenaje linfático, diferencias en la morfología del tejido y/o diferencias en afinidad por algún tejido y/o receptor [Kagan, 2014; Richter y Jacobsen, 2014]. También se han observado variaciones entre individuos de la misma especie, atribuibles a peso, edad, género, y al sitio de inoculación [Kota, 2007; Kagan, 2014]. Otro de los factores que controlan la velocidad de absorción y la biodisponibilidad son el tamaño molecular (Figura 1) y las propiedades fisicoquímicas de la proteína en cuestión [Kinnunen y Mrsny, 2014]. Con

la administración SC, las proteínas son liberadas en el espacio intersticial de la hipodermis, también conocido como tejido SC



**Figura 1. Vida media en espacio subcutáneo**

Relación entre el peso molecular y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) en el sitio de inoculación después de administración SC. bevacizumab (149 kDa), albúmina bovina sérica (BSA) (66 kDa), ovoalbúmina (OVA) (44.3 kDa) y factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF-C156S) (23 kDa). [Wu *et al.*, 2012].

### 2.2.1 Tejido subcutáneo

Este espacio está conformado por capilares sanguíneos y linfáticos, adipositos, macrófagos y fibroblastos que sintetizan los componentes de la matriz extracelular, representada por el tejido conectivo. La matriz extracelular es una barrera fisiológica en la liberación de proteínas administradas vía SC [Richter *et al.*, 2012], ya que funciona como una matriz de exclusión molecular, en donde solutos con un radio Stokes-Einstein mayor se transportan más rápido que los pequeños, mientras que el líquido intersticial promueve la difusión y convección de los mismos [Wiig y Swartz, 2012].

### 2.2.1.1 Matriz extracelular

La matriz extracelular da soporte y arquitectura al espacio extracelular y tiene un papel determinante en el desarrollo, migración, proliferación, forma y función de las células que están en contacto con sus componentes [Aukland y Read, 1993]. Su estructura ha sido ampliamente descrita en varios reportes [Richter *et al.*, 2012; Bosman y Stamenkovic, 2003]. Está conformada principalmente por:

- Colágenos. Son proteínas ubicuas que se asocian en cadenas de polipéptidos conocidas como fibrillas, y forman estructuras supra-macromoleculares. Se les clasifica con base en su ensamble y a la fecha se conocen 27 tipos de colágenos con funciones distintas. En general, son responsables de mantener la integridad estructural de los organismos. En pH fisiológico tienen carga positiva.
- Elastina. Es una proteína que promueve la contracción y el estiramiento. Es un polímero insoluble constituido por tromboelastina soluble y fibrilina (glicoproteína) y forma distintas fibras dependiendo del tejido.
- Glicoaminoglicanos (GAG): Son unidades repetidas de disacáridos con sustituciones de hexosamina y ácido urónico. El ácido hialurónico (ó hialurano) es el GAG más común en la hipodermis, y gracias a su carga negativa, promueve el transporte de moléculas con la misma carga, controla el contenido de fluido intersticial y la conductividad hidráulica del intersticio. Otros GAGs como heparin sulfato, heparina y condritin 4- y 6- sulfato se unen covalentemente a núcleos proteicos para formar proteoglicanos (PG).

### 2.2.1.2 Líquido intersticial

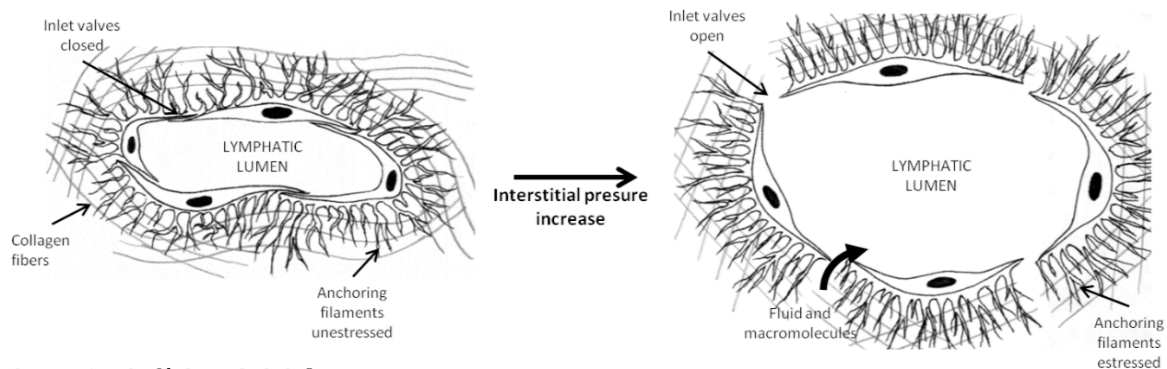
Está compuesto por agua y una variedad de solutos. Este fluido se encarga de transportar nutrientes y desechos entre las células y los capilares sanguíneos, moléculas de señalización entre células y antígenos, y citocinas a ganglios linfáticos

para regulación inmune. El volumen de este fluido se mantiene constante y es cercano al 20% del peso corporal [Swartz, 2001].

Cuando se da un cambio en el volumen del fluido intersticial, hay un aumento en la presión, determinado por la capacidad de deformación del tejido, que depende de la cantidad de hialurano y de la integridad de la matriz extracelular. El aumento en la presión intersticial genera un gradiente de presión que modifica la movilidad del líquido intersticial (conductividad hidráulica), el intercambio transcapilar, y la formación de la linfa. Esto tiene un efecto importante en la distribución de proteínas plasmáticas y transporte de fluido [Wiig y Swartz, 2012].

### 2.2.2 Sistema linfático

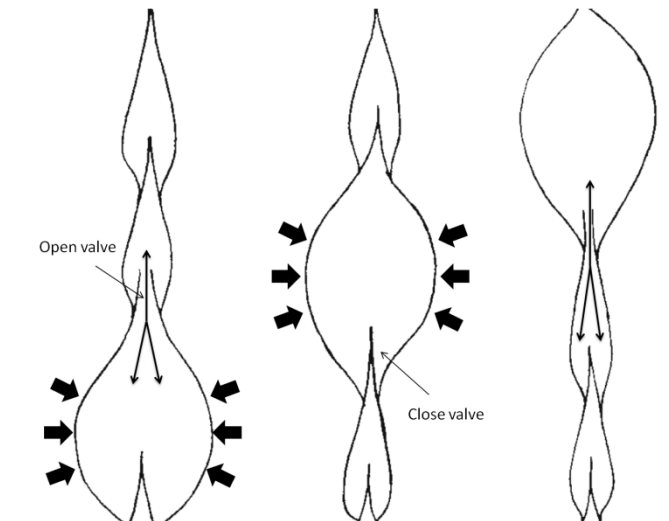
El sistema linfático es una red de vasos y ductos capilares que se distribuyen prácticamente por todos los tejidos, a excepción de los huesos y tendones. Este sistema comienza con los vasos linfáticos iniciales, que son estructuras formadas por una capa de células endoteliales, con uniones celulares laxas, cuyo empalme da lugar a un sistema de válvulas. Estas células están unidas a la matriz extracelular por filamentos de anclaje, de tal manera que, cuando la presión intersticial aumenta, las válvulas se abren permitiendo el paso del fluido intersticial a los capilares linfáticos. Cuando la presión intersticial disminuye, las válvulas se cierran y evitan el flujo retrógrado de la linfa (Figura 2). La unión de las células endoteliales tiene una permeabilidad amplia, lo que provoca muy poca o nula exclusión molecular durante la formación de la linfa [Swartz, 2001].



**Figura 2. Linfáticos iniciales**

Cambio conformacional de los linfáticos iniciales cuando la presión intersticial aumenta.

Una vez que la linfa se encuentra en capilares linfáticos, es drenada hacia los vasos colectores, que son estructuras formadas por células endoteliales y músculo liso, lo que las hace más resistentes a la presión interna. Estos vasos tienen válvulas bicúspides unidireccionales que impiden el flujo retrogrado de la linfa. Los segmentos entre cada válvula se les conoce como linfagiones (Figura 3). La propulsión de la linfa a través de esta red se da como consecuencia de la contracción de cada uno de estos segmentos, producida por el músculo liso que los recubre (bomba intrínseca), y el movimiento de los músculos y el sistema venoso adyacente (bomba extrínseca). Ambos procesos impulsan a la linfa al siguiente segmento, provocando un flujo peristáltico [Swartz, 2001].



**Figura 3. Linfagiones.**

Estructura de los ductos linfáticos y el mecanismo de propulsión a través de ellos.

Los vasos colectores pasan a través de ganglios linfáticos, que son estructuras capsulares, cuya función principal es generar una respuesta inmune eficiente contra elementos extraños que han entrado al organismo. En estas estructuras se encuentran glóbulos blancos, que pueden fagocitar moléculas y partículas, lo que contribuye a retener ciertas proteínas. En los ganglios también se da un intercambio de fluidos con

la circulación sanguínea, lo que genera una concentración proteica similar a la que se encuentra en plasma [Swartz, 2001].

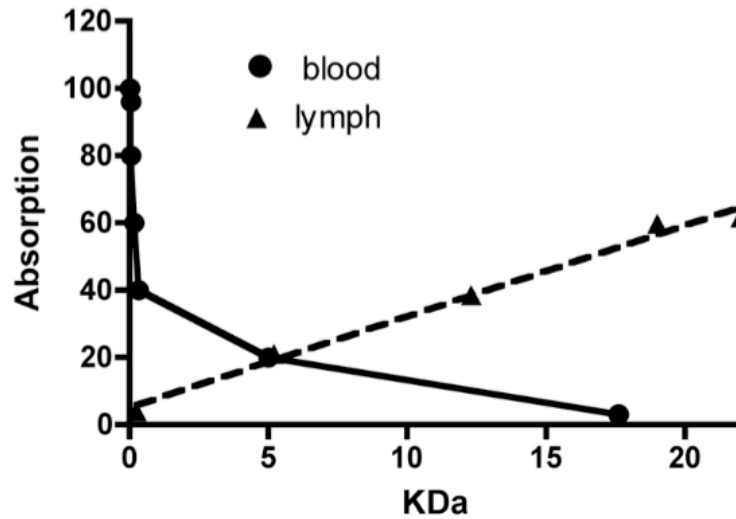
La red de vasos linfáticos de la parte inferior y del cuadrante superior izquierdo del cuerpo convergen en una estructura llamada “cisterna del quilo”, en donde se junta la linfa y fluye hacia un ducto único, el ducto torácico. Éste desemboca en la vena yugular izquierda, mientras que los vasos linfáticos de la cabeza y el cuadrante superior derecho convergen en el ducto derecho, que desemboca en la vena subclavia derecha, incorporando al torrente sanguíneo, los compuestos absorbidos desde el espacio intersticial [Swartz, 2001].

### **2.2.3 Absorción diferencial**

La absorción por el sistema linfático es más lenta debido a que su capacidad de reabsorción de fluidos es de 2 a 4 L/día, en comparación con la velocidad de filtración y reabsorción de fluidos a través de capilares sanguíneos (20 - 40 l/día) [Porter y Charman, 2000]. La diferencia en la velocidad de flujo también provoca que las moléculas que son igualmente permeables en ambas estructuras capilares (menores a 10 nm), sean predominantemente absorbidas por los vasos sanguíneos [Swartz, 2001]. Sin embargo, la permeabilidad de los capilares sanguíneos disminuye conforme aumenta el peso molecular [Guyton y Hall, 2001], mientras que los linfáticos iniciales tienen una permeabilidad laxa [Swartz, 2001]. Debido a lo anterior, conforme aumenta el peso molecular, aumenta la participación del sistema linfático en la absorción, como lo reportaron Supersaxo *et al.*, en 1990, quienes encontraron una correlación directa y lineal entre el peso molecular y la absorción linfática (Figura 4).

La participación del sistema linfático en la absorción de venenos nunca ha sido explorada de manera formal, aunque ha sido sugerida desde 1940 por Fidler *et al.*, y por Barnes y Trueta en 1941.





**Figura 4. Permeabilidad de capilares**

Correlación entre peso molecular y absorción a través de capilares sanguíneos y linfáticos (Adaptado de Guyton and Hall 12th ed, y Supersaxo *et al.* 1990)

#### 2.2.4 Modelo de estudio

Al hacer un análisis FC en un modelo animal, se busca tener información que se aproxime a lo que sucede en un humano. La mayoría de los modelos utilizados son animales pequeños como ratones, ratas y conejos en los que por la diferencia de talla tienen mayor irrigación en órganos lo que impacta la velocidad de distribución y absorción de la proteína a analizar [Upton, 2008]. Uno de los modelos animales de talla grande más utilizados para estudiar la participación del sistema linfático en la absorción de proteínas administradas vía SC, es el borrego [Supersaxo *et al.*, 1990; Porter y Charman, 2000; McLennan *et al.*, 2005; Kota *et al.*, 2007], ya que algunos parámetros FCs han mostrado dar mejores aproximaciones a los parámetros obtenidos en humanos en el estudio FC de proteínas [Woo y Jusko, 2007; Porter *et al.*, 2001].

## 2.3 Distribución

Debido a su tamaño, las proteínas tienen movilidad limitada a través de las membranas. La concentración plasmática de una proteína depende de la cantidad que se absorbe a circulación sistémica y el volumen en el que se distribuye. Por lo tanto, su distribución está determinada principalmente por su tamaño, sus propiedades fisicoquímicas y su afinidad por tejidos u otras proteínas endógenas [Tang y Meibohm, 2006].

Generalmente se distribuyen en dos etapas. Primero se distribuyen en el espacio vascular y el espacio intersticial de órganos altamente irrigados con capilares permeables, como los riñones y el hígado (Tabla 2). El volumen de distribución que se calcula para esta etapa ( $V_c$ ) generalmente es igual o ligeramente mayor al volumen plasmático (del 7 al 11% del peso corporal).

En segundo lugar, se da la distribución en el espacio intersticial de tejidos con baja perfusión, como la piel y el músculo inactivo (Tabla 2). En esta etapa se establece el estado estacionario y el volumen de distribución ( $V_{ss}$ ) generalmente no excede el doble del volumen de distribución inicial (de 20 al 28% del peso corporal). Por lo cual, después de la administración IV, las proteínas suelen presentar un perfil FC de decaimiento bi-exponencial.

Los valores de los volúmenes de distribución ( $V_c$  y  $V_{ss}$ ) pueden incrementar sustancialmente, ya que algunas proteínas tienen afinidad o unión a proteínas intra- o extravasculares. Algunas otras pueden penetrar las membranas celulares y llegar a citoplasma, sin embargo esto depende de su tamaño, hidrofobicidad y afinidad a transportadores y/o receptores [Tang y Meibohm, 2006].

### 2.3.1 Eliminación

El proceso de eliminación se refiere a la remoción irreversible de la proteína del organismo, y se da por excreción y/o metabolismo [Shargel *et al.*, 2005].

La excreción se refiere a la eliminación de la sustancia intacta, sin embargo las rutas de excreción, como la renal o la biliar son despreciables para la mayoría de los péptidos y proteínas [Shargel *et al.*, 2005; Tang y Meibohm, 2006].

El metabolismo de una sustancia se refiere al cambio en su estructura química y en general, las proteínas se eliminan por la misma ruta catabólica de proteínas endógenas y consumidas en la dieta, lo que da lugar a la reutilización de aminoácidos para la síntesis *de novo* de proteínas estructurales y funcionales. El metabolismo de proteínas no sólo se da en riñones, hígado o tracto gastrointestinal, también puede darse en sangre y otros tejidos, ya que las enzimas proteolíticas se encuentran en todo el organismo [Tang y Meibohm, 2006].

Los factores determinantes en la velocidad y mecanismo de eliminación son el peso molecular, carga total de la proteína, hidrofobicidad, patrones de glicosilación, grupos funcionales, estructura y tendencia a la agregación [Tang y Meibohm, 2006].

En la Tabla 3 se muestran los mecanismos de eliminación en función del peso molecular y otros factores determinantes.

**Tabla 3. Mecanismo de eliminación de proteínas**

Peso molecular (Da)	Sitio de eliminación	Mecanismo de eliminación	otros factores
< 500	Sangre, hígado	Hidrólisis extracelular Difusión lipóide pasiva	Estructura, lipofiliidad
500 – 1,000	Hígado	Captación mediada por acarreador Difusión lipóide pasiva	Estructura, lipofiliidad
1000 – 50,000	Riñón	Filtración glomerular seguido de procesos de degradación	Peso molecular
50,000 – 200,000	Riñón, hígado	Endocitosis mediada por receptor	Carga, glicosilación
200,000 – 400,000		Opsonización	$\alpha$ 2-macroglobulina, IgG
>400,000		Fagocitosis	Agregación de partículas

Adaptado de Tang y Meibohm, 2006.

### 2.3.1.1 Metabolismo renal

En los riñones, la presión arterial alta da lugar a la filtración glomerular [Shargel *et al.*, 2005].

El riñón es el principal órgano de eliminación para proteínas administradas vía parenteral y/o endógenas, siempre y cuando su tamaño no exceda los 60 kDa (límite de filtración glomerular) y su carga sea de preferencia neutra [Tang y Meibohm, 2006]. Sin embargo, es muy poca la proteína intacta que puede detectarse en orina, ya que la eliminación renal está mediada por tres procesos metabólicos:

1. Los péptidos grandes y complejos se filtran por glomérulos, de ahí se reabsorben a vesículas endocíticas que se encuentran en el lumen del túbulo proximal, donde son hidrolizadas a pequeños fragmentos peptídicos y aminoácidos [Tang y Meibohm, 2006].
2. Los péptidos pequeños y lineales se filtran por glomérulo, y son metabolizados por exopeptidasas que se encuentran en la membrana del cepillo luminal de los túbulos proximales. Los péptidos y aminoácidos resultantes se reabsorben a circulación sistémica [Tang y Meibohm, 2006].
3. La proteínas que no son filtradas por glomérulo, son extraídas de peritúbulos a capilares postglomerulares, donde se metabolizan vía intracelular [Tang y Meibohm, 2006].

En los primeros dos mecanismos, la filtración glomerular es el paso limitante, ya que los procesos de degradación subsecuentes no se saturan en condiciones fisiológicas. Por lo anterior, la contribución renal en la eliminación de péptidos y proteínas es reducida si la actividad metabólica de las proteínas en cuestión es elevada en otras regiones del organismo, y se vuelve despreciable en comparación con la degradación inespecífica. En contraste, la contribución renal en la eliminación de péptidos y proteínas es cercana al 100% si la actividad metabólica es baja en otros tejidos, y su distribución es limitada [Tang y Meibohm, 2006].

### **2.3.1.2 Metabolismo hepático**

El metabolismo hepático se lleva a cabo dentro de los hepatocitos. Los péptidos pequeños cruzan la membrana por difusión pasiva, si tienen la hidrofobicidad suficiente. La internalización de proteínas mas grandes está mediada por receptores que reconocen patrones de glicosilación [Tang y Meibohm, 2006].

La proteólisis generalmente comienza con endopeptidasas que hidrolizan el centro de la proteína, generando oligopéptidos que son degradados por exopeptidasas. Los metabolitos finales (aminoácidos y dipéptidos) se reutilizan en el pool de aminoácidos endógenos [Tang y Meibohm, 2006].

La velocidad de metabolismo hepático depende de las secuencias de los aminoácidos en la proteína [Tang y Meibohm, 2006].

### **2.3.2 Análisis farmacocinético**

Todos los procesos descritos anteriormente, son analizados por la FC, que es la rama de la farmacología que analiza la cinética de la absorción, distribución y eliminación. La naturaleza biológica de estos procesos es compleja y suceden de manera simultánea. Su estudio requiere de análisis matemático y estimación de parámetros FCs que permiten una correlación cuantitativa [Shargel *et al.*, 2005].

## **2.4 Farmacocinética de venenos**

Para imitar la patofisiología real de un envenenamiento, algunos trabajos han explorado la FC de venenos de serpientes (principalmente vipéridos) administrándolos vía IM. Estos trabajos reportan una biodisponibilidad incompleta (de 4 a 67%) y una absorción bifásica que involucra procesos de cero y primer orden, lo que provoca que el veneno llegue rápidamente a la circulación y que se mantenga a concentraciones altas en el plasma por tiempo prolongado [Audebert, *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 2014; Yap *et al.*, 2013; Sim *et al.*, 2013]. Incluso, se ha propuesto que los componentes de los venenos se absorben a velocidades distintas ya que se observan picos secundarios en las concentraciones máximas de veneno en suero [Tan *et al.*, 2014; Yap *et al.*, 2013; Sim *et al.*, 2013]. En los venenos de vipéridos, se han observado volúmenes de distribución muy por encima del volumen de sangre, debido a la afinidad por proteínas plasmáticas, u otros componentes sanguíneos [Tan *et al.*, 2014; Yap *et al.*, 2013; Sim *et al.*, 2013], o a su distribución intracelular [Chippaux, 2006].

### **2.4.1 Componentes del veneno y su absorción**

Algunos componentes del veneno pueden modificar los procesos involucrados en la absorción y distribución de las toxinas, modificando los perfiles FCs descritos para proteínas similares.

#### **2.4.1.1 Hialuronidasas como factor de dispersión**

La hialuronidasa es la enzima más ubicua en los venenos, ya que se ha encontrado en veneno de arañas, serpientes, alacranes, abejas, avispa, orugas, peces y lagartos [Girish *et al.*, 2002].

Esta enzima degrada el hialurano de la matriz extracelular, lo que reduce su viscosidad e incrementa la permeabilidad del fluido a través de las fibras de colágeno.

Duran-Reynals en 1939, reportó por primera vez la presencia de un “factor de dispersión” y sugirió que era independiente del factor tóxico del veneno de serpientes. En 1940, Chain y Duthie, relacionaron este factor de dispersión a la actividad hialuronidasa, y en 2006, Bookbinder *et al.*, probaron que al coadministrar hialuronidasa humana recombinante (rHuPH20) con bioterapéuticos, aumentaba su velocidad de infusión, dispersión, concentración plasmática y biodisponibilidad. Por lo tanto, es de esperar que su presencia en los venenos funcione de la misma manera (Girish *et al.*, 2002; Yingprasertchai *et al.*, 2003). Tu y Hendon en 1983 mostraron que la hialuronidasa esparce la hemorragia en ratones cuando se coadministra con una toxina hemorrágica de *Trimeresurus flavoviridis*. La coadministración de hialuronidasa de *Naja naja*, con una miotoxina y un complejo hemorrágico de *Daboia russellii*, potenció la actividad miotóxica y hemorrágica. Lo anterior, demostró que la actividad hialuronidasa en el veneno no solo repercute en los efectos locales, también en la magnitud de los efectos sistémicos [Girish *et al.*, 2004].

#### **2.4.1.2 Otros componentes que alteran la absorción del veneno**

Algunos venenos producen edemas prominentes y hemorragias extensas. Esta sintomatología no se ha relacionado de manera formal con la FC de venenos, sin embargo, podemos asumir una influencia, ya que estos síntomas modifican las presiones hidrostáticas del tejido y la permeabilidad de endotelio capilar, factores importantes en los procesos de absorción y distribución de proteínas, como se revisó en las secciones anteriores. Las principales toxinas responsables de esta sintomatología son las metaloproteasas (SVMP) y las miotoxinas.

Las metaloproteasas degradan proteínas de la membrana basal, provocando que fuerzas hemodinámicas, produzcan distensión en la pared capilar y en consecuencia, extravasación de eritrocitos y hemorragias [Gutiérrez *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2005]. Aunado a esto, provocan daño y pérdida de tejido esquelético [Bjarnason y Fox, 1994], formación de ámpulas, coagulopatías, alteración de plaquetas y actividad proinflamatoria que promueve la infiltración de leucocitos en la dermis [Bjarnason and Fox, 1994; Hati *et al.*, 1999; Kamiguti *et al.*, 1998].

Por su parte, las miotoxinas producen la contracción de vasos linfáticos, reducción de lumen y eventualmente interrupción del flujo de linfa, debido al efecto miotóxico sobre el músculo que recubre los vasos linfáticos [Mora *et al.*, 2008].

La PLA<sub>2</sub> Asp 49 no miotóxica, induce edema a partir de la liberación de ácido araquidónico, que es uno de los mayores precursores de prostanoideos (prostaglandina y leucotrienos). Estos mediadores de inflamación alteran la microvasculatura, lo que incrementa la permeabilidad y la formación de edema en el sitio de la mordedura [Doley *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2003].

## **2.5 *Micrurus fulvius* como modelo**

### **2.5.1 *Micrurus fulvius***

El veneno de *Micrurus fulvius* es relativamente simple, ya que su toxicidad está relacionada únicamente a fosfolipasas tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) neurotóxicas que representan el 58% del veneno [Vergara *et al.* 2014]. Tiene actividad hialuronidasa baja en

comparación con otras especies y aunque se ha reportado ligera miotoxicidad en ratones, nunca ha sido un síntoma clínico [Vergara *et al.* 2014].

*Micrurus fulvius* es una serpiente venenosa que pertenece a la familia *Elapidae*, se le conoce como serpiente de coral o coralillo y es endémica de Estados Unidos [Sánchez *et al.*, 2008].

Los accidentes por mordedura de *Micrurus* en humanos son escasos debido a su conducta no agresiva y a sus hábitos nocturnos [Kitchens y Van Mierop, 1987]. Se les atribuyen alrededor de 100 mordeduras al año [Walter *et al.*, 1999]. Debido a ello, la investigación del envenenamiento por esta especie es escasa. Sin embargo, la alta toxicidad de su veneno (la dosis mínima mortal de veneno de esta especie se estima en 4-6 mg para un humano adulto), hace que estos accidentes tengan importancia médica, ya que pueden ser mortales [Roze, 1996].

La sintomatología es principalmente neurológica, puede o no presentarse y su evolución es variable e impredecible [Kitchens y Van Mierop, 1987].

Los primeros síntomas por envenenamiento de *Micrurus fulvius* pueden presentarse desde los 30 minutos hasta 12 horas después de la mordedura [Kitchens y Van Mierop, 1987; Wood, *et al.*, 2013]. Pueden incluir dolor local, sensación de hormigueo, náusea, vómito, debilidad, fasciculaciones musculares, visión doble, parálisis flácida progresiva, dificultad para respirar e incluso parálisis respiratoria, siendo la principal causa de muerte en estos accidentes [Ramsey y Klickstein, 1962; Bucarechi, 1990; Walter *et al.* 1999; Kitchens y Van Mierop, 1987; Wood *et al.*, 2013]. El pronóstico de cómo evolucionará un envenenamiento por *M. fulvius* puede resultar complicado. Las variables son muchas, en especial la cantidad de veneno inoculado [Walter *et al.*, 1999] y el tiempo (a veces muy largo), en que empieza la sintomatología neurotóxica. Además, muchas mordeduras son causadas por falsas coralillos lo que confunde la situación. A todo ello, habría que agregarle que las marcas de los colmillos, en ambos casos, son poco notorias y pocas veces se presenta edema [Kitchens y Van Mierop, 1987; Wood *et al.*, 2013].



### 2.5.2 Veneno y mecanismo de acción

A pesar de que el mecanismo de acción no está bien caracterizado, se propone que las PLA<sub>2</sub> neurotóxicas se unen a una zona activa en la membrana del axón presináptico de la unión neuromuscular, hidrolizan los fosfolípidos de la capa externa y alteran la conformación membranal. En un inicio, promueven la exocitosis de la acetilcolina, para después inhibir el reciclaje y fusión de vesículas nuevas, impidiendo la liberación del neurotransmisor [Rossetto y Montecucco, 2008]. Se ha observado que la toxina se interna en el axón, se une a la mitocondria de manera específica y promueve la formación de poros de transición [Rigoni *et al.*, 2008], que da lugar a la degeneración del axón [Barrientos *et al.*, 2011]. La degeneración del botón presináptico causada por las PLA<sub>2</sub> neurotóxicas ocasiona que la parálisis resultante tarde en recuperarse muchos días, como se ha observado con la  $\beta$ -bungarotoxina [Prasarnpun *et al.*, 2005].

La utilización temprana y oportuna del AV, previene el desarrollo de la parálisis y la necesidad de intubar endotraquealmente al paciente para asistirlo en la respiración de manera artificial [Walter *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2013]. Una vez establecida la parálisis respiratoria, el efecto del AV es más limitado y debe complementarse con respiración asistida, que puede durar varios días [Kitchens y Van Mierop, 1987; Wood, *et al.*, 2013].

Con base en ello, se sugiere que el AV se aplique antes de que los síntomas se desarrollen. La decisión de aplicar AV depende del médico tratante, ya que no hay criterios pronósticos claros para su empleo. Sin embargo, el envenenamiento causado por *M. fulvius*, así como por otras especies de coralillos, puede ser muy grave, por lo que en la práctica médica, se recomienda utilizarlo de manera temprana [Wood *et al.*, 2013].

## 2.6 Antivenenos

Desde que Behring y Kitasato, en 1890, confirmaron clínicamente la transferencia pasiva de inmunidad, se desarrolló la terapia sérica. Calmette fue el

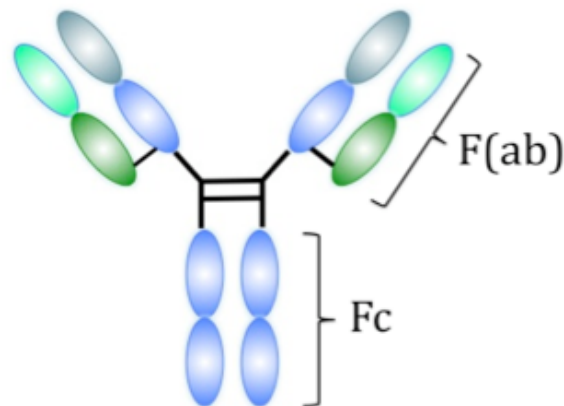
primero en preparar un suero como AV contra el envenenamiento por cobras Indias [Chippaux, 2006].

Actualmente el único tratamiento efectivo contra el envenenamiento es el uso del AV específico y la efectividad de su neutralización se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, empleando inmunoglobulinas dirigidas contra las diversas moléculas del veneno.

La producción de AVs no ha cambiado mucho. Actualmente se utilizan esquemas de inmunización en donde la cantidad de veneno inoculada va aumentando paulatinamente (hiperinmunización), a fin de conseguir la mayor respuesta inmune.

Los AVs pueden ser monovalentes, cuando se utiliza sólo un veneno para la inmunización, o polivalentes, cuando se utiliza una mezcla de venenos, lo que aumenta el espectro de neutralización [Chippaux, 2006]. Generalmente este proceso se realiza en caballos. Cuando se alcanza una cantidad elevada de anticuerpos específicos, se extrae el plasma y se purifican los anticuerpos [Chippaux, 2006].

Para disminuir el riesgo de reacciones anafilácticas se realizan diversos procesos de purificación de las inmunoglobulinas y algunas compañías producen fracciones de anticuerpos, mediante la digestión con pepsina para obtener  $F(ab')_2$  y papaína para la obtención de Fab.



**Figura 5. Inmunoglobulina G**

Los fragmentos F(ab) son los responsables de reconocimiento al antígeno, mientras el fragmento Fc se conoce como fracción cristalizable y reconocida a varios receptores celulares y proteínas del complemento. Este tipo de interacciones da lugar a efectos fisiológicos tales como la opsonización, lisis celular, degranulación de células mastoides, basófilos y eosinófilos [Vázquez, 2010]

### 2.6.1 Farmacocinética de antivenenos (AV)

Las propiedades FCs de los AVs varían entre ellos. Mientras los AV en formato de Fab (50 kDa), tienen un volumen de distribución (Vss) alto, que favorece la neutralización del veneno distribuido en órganos y el espacio extravascular, tienen una vida media ( $t_{1/2}$ ) muy corta, en comparación con la del veneno de serpientes. Las IgG's (150 kDa) por su parte, tienen una  $t_{1/2}$  más larga, que permite la neutralización continua del veneno que se sigue absorbiendo del sitio de inoculación durante días, pero su peso molecular elevado reduce su Vss. Esto ocasiona que la neutralización de veneno localizado fuera del espacio vascular no sea tan eficiente [Gutiérrez *et al.*, 2003].

Los AV-F(ab')<sub>2</sub> (100 kDa), parecen tener un buen balance entre Vss y  $t_{1/2}$ , lo que permite que el AV permanezca en circulación por tiempo prolongado y tenga la capacidad de neutralizar al veneno que se va absorbiendo desde el sitio de la mordedura hasta la circulación sistémica. También le da la capacidad de neutralizar al veneno que se encuentra en el espacio extravascular [Gutiérrez *et al.*, 2003]. Debido a ello, las recurrencias de envenenamiento están ausentes en la práctica clínica [Boyer *et al.*, 2013].

En la Tabla 4 se comparan parámetros FCs de AVs administrados por vía IV.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos de AV

Tipo de AV	Origen	Modelo animal	Vd (mL/kg)	t <sub>1/2,1</sub> (h)	t <sub>1/2,2</sub> (h)	t <sub>1/2,3</sub> (h)	CL (mL/h/kg)	Referencia		
IgG	Caballo	Conejo	-	2.12 ±0.38	5.22 ±0.98	46.4 ±4.8	0.35 ±0.06	Ismail <i>et al.</i> , 1992		
			162 ±1.9	0.49 ±0.07	5.98 ±0.67	42.7 ±2.04	5.46 ±0.6	Ismail <i>et al.</i> , 1998		
	cabra	Humano	-	-	-	158.4	-	Seifert y Boyer, 2001		
			90	0.46	-	82	0.525*	Seifert y Boyer, 2001		
F(ab') <sub>2</sub>	Caballo	Conejo	209 ±24	2.66 ±0.18	-	49.7 ±4.13	3.33 ±0.38	Pepin <i>et al.</i> , 1995		
			265 ±34	2.66 ±0.74	-	46.93 ±5.92	3.96 ±0.75	Pepin <i>et al.</i> , 1995		
			-	0.2 ±0.05	0.95 ±0.12	28.38 ±3.24	-	Ismail <i>et al.</i> , 1992		
			230 ±26	2.54 ±0.36	-	49.52 ±3.07	3.56 ±0.34	Pepin-Covatta, 1996		
			216 ±9	0.22 ±0.05	2.33 ±0.45	33.84 ±0.93	5.4 ±0.54	Ismail <i>et al.</i> , 1998		
			130 ±5	2.9 ±0.7	-	55 ±9	2.1 ±0.01	Rivière <i>et al.</i> , 1997		
		554	0.16	2.48	113.2	3.88	Vázquez <i>et al.</i> , 2010			
		Borrego	255	0.24	0.96	-	-	Sevcik <i>et al.</i> , 2004		
		Humano	233	0.3	-	96	1.279*	Seifert y Boyer, 2001		
			-	-	18	-	-	Seifert y Boyer, 2001		
			204	0.25	3.3	161.3	1.61*	Vázquez <i>et al.</i> , 2005		
		Fab	Caballo	Conejo	230 ±2	0.7 ±0.02	-	8 ±0.3	53 ±0.5	Rivière <i>et al.</i> , 1997
					110	2.7	18	-	5.7*	Seifert y Boyer, 2001
	oveja		Humano	-	-	4.3	-	-	Seifert y Boyer, 2001	
10.8				-	12.1	-	23.4*	Seifert y Boyer, 2001		
430				-	14	-	0.324	Seifert y Boyer, 2001		
369				-	9.3	-	0.389	Seifert y Boyer, 2001		
669				-	23.9	-	7.1*	Seifert y Boyer, 2001		
2,751				-	-	56.3	6.3*	Seifert y Boyer, 2001		
95				-	-	71.8	2.6*	Seifert y Boyer, 2001		
163				-	-	45.6	2.3*	Seifert y Boyer, 2001		
290				-	-	82	0.049*	Seifert y Boyer, 2001		
36.2				-	49.9	138.6	3.02*	Seifert y Boyer, 2001		

\*Valores reportados en mL/min

## 2.7 Disparidad farmacocinética y recurrencia

En la práctica médica son frecuentes las recurrencias de envenenamiento 3 ó 4 días después de administrar el AV [Boyer *et al.*, 1999; Bush *et al.*, 2013]. Una de la hipótesis planteadas es que se da una redistribución del veneno desde tejido profundo hacia sangre, debido a la ley de acción de masas, que incrementa con el gradiente de concentración, que se genera tras la eliminación del veneno en sangre [Chippaux, 2006]. Otra hipótesis se basa en la retención del veneno en el sitio cercano a la mordedura ya que se ha encontrado veneno en sitios cercanos días después del accidente, aun cuando se ha aplicado el AV correspondiente [Reid y Theakston, 1983]. A partir de lo anterior, se plantea que el sitio de inoculación funciona como un

depósito desde donde el veneno se libera paulatinamente, impactando la evolución y gravedad del envenenamiento. [Reid y Theakston, 1983; Seifert *et al.* 1997]. Sin embargo, este fenómeno nunca ha sido estudiado sistemáticamente.

Diversos reportes señalan la ausencia de un tratamiento óptimo para casos de envenenamiento, debido a una discordancia entre la FCs del veneno y del AV [Gutiérrez *et al.*, 2003; Seifert y Boyer, 2001].

Las características óptimas de cada AV, sólo se podrán conocer si se hace un análisis detallado de la FC del veneno, y se desarrolla mayor conocimiento sobre el mecanismo y el tiempo de acción de las toxinas que lo componen [Gutiérrez *et al.*, 2003]. Un mejor conocimiento en el proceso del envenenamiento ayudaría a proponer mejores estrategias en la terapia [Wood *et al.*, 2013].

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los procesos involucrados en la absorción y distribución de veneno de serpientes nunca han sido explorados. Sin embargo, estos procesos están directamente asociados a la evolución sintomatológica del envenenamiento. La ausencia de este conocimiento ha provocado el uso empírico del AV correspondiente, lo que da lugar a recurrencias en envenenamientos y administración de grandes cantidades de AV.

Es de esperar que el AV, al administrarse vía IV, siga una cinética distinta a la del veneno y que su distribución sea diferente. Esta vía de administración, podría limitar la capacidad neutralizante sobre el veneno que no esté en circulación, ya sea porque se haya distribuido o esté en proceso de absorción. Algunos reportes muestran la neutralización del veneno circulante, e incluso una redistribución de éste desde los tejidos a sangre. Se ha sugerido que el veneno que se encuentra en el sitio de inoculación no es neutralizado de manera eficaz y nunca se ha explorado la neutralización del veneno que pudiera absorberse por vía linfática, aún cuando la participación del sistema linfático podría impactar varios parámetros FCs que se relacionan directamente con el envenenamiento.

Determinar la participación del sistema linfático en la FC del veneno de *Micrurus fulvius* y en su neutralización, explora por primera vez, la complejidad de los procesos cinéticos involucrados en el envenenamiento ofídico y en su tratamiento, abriendo una nueva perspectiva en la toxicología.

## 4 HIPÓTESIS

El sistema linfático tiene un papel relevante en la absorción y distribución del veneno de *Micrurus fulvius* cuando se administra vía subcutánea, lo que promueve la disparidad farmacocinética al administrar el antiveneno vía intravenosa.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 *Objetivo general*

Analizar la participación del sistema linfático en la disparidad FC entre el veneno de *Micrurus fulvius* y el AV correspondiente, considerando la influencia del sistema linfático en la neutralización

### 5.2 *Objetivos particulares*

1. Establecer la FC del veneno de *Micrurus fulvius* cuando se administra vía IV.
2. Establecer la FC del veneno de *Micrurus fulvius* cuando se administra vía SC.
3. Determinar la participación del sistema linfático en el proceso de absorción y distribución sistémica del veneno.
4. Determinar la FC del AV administrado vía IV.
5. Analizar la modificación de la FC del veneno administrado vía SC cuando se administra el AV vía IV.
6. Analizar la neutralización del veneno en el sitio de inoculación y en el sistema linfático cuando el AV se administra vía IV.

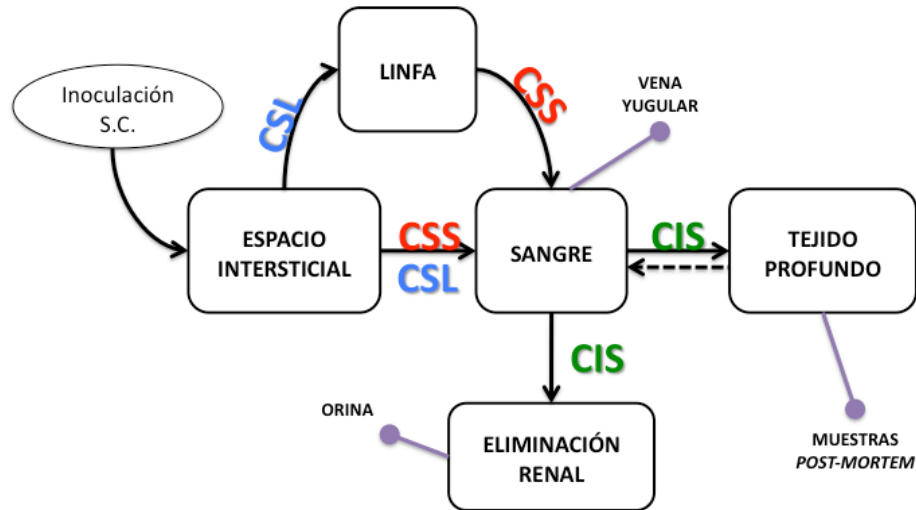
## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 *Diseño experimental*

El estudio FC se realizó en 24 borregos Suffolk-Pelibuey de 40-55 kg, de ambos sexos, obtenidos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), Huitzilac, Morelos.

Para analizar la FC del veneno, se plantearon tres grupos experimentales con cuatro individuos cada uno. A cada individuo se le administró una dosis de veneno de *Micrurus fulvius* disuelto en 1 mL de NaCl 150 mM. Para una aproximación más cercana a un envenenamiento real, la dosis administrada se determinó por grupo sin considerar el peso del individuo. Por motivos bioéticos, todos los experimentos con veneno se hicieron con anestesia general, y bajo un esquema quirúrgico para colocar las cánulas. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron con la colaboración del Dr. Camilo Romero Núñez y la M.V.Z. Lucia Jiménez Martínez. Las cinéticas duraron 6 horas ya que en la posición requerida para la cirugía, los borregos generan edema pulmonar, haciendo imposible mantener la anestesia por más tiempo. En todos los grupos se tomaron muestras de sangre, orina y órganos (*post mortem*) con la colaboración de la M en C. Irene Vergara Bahena, M. en C. Arlene Calderón, la M en C. Melisa Benard. En la Figura 6 se esquematiza el diseño experimental.





**Figura 6. Diseño experimental**

Grupos experimentales diseñados para analizar los procesos FCs involucrados en el envenenamiento. Con el grupo CIS se analizó la biodistribución del veneno, así como su eliminación, administrando 1 mg en los dos primeros borregos por vía IV y 0.5 mg en los dos siguientes. Con el grupo CSS se analizó el proceso de absorción desde el sitio de inoculación hasta el torrente sanguíneo administrando 5 mg de veneno vía SC en el miembro pélvico derecho. En el grupo CSL se analizaron las vías de absorción linfática y sanguínea desde el sitio de inoculación por separado. Para cada grupo se utilizaron 4 individuos. En todos los grupos se tomaron muestras de sangre de la vena yugular, orina y muestras de tejido *post mortem*, para analizar la posible acumulación del veneno en algunos de los órganos.

## 6.2 Veneno

Veneno liofilizado extraído de 10 especímenes de *Micrurus fulvius*, provisto por Natural Toxins Research Center (NTCR, TAMUK, Kingsville, Texas.).

## 6.3 Antivenenos

- Coralmyn® : AV polivalente de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos equinos, contra el veneno de *Micrurus sp.* producido por el Instituto Bioclon. Lotes B-9G-12 y B-8D-04.
- INA2013-BB-IND13926: AV de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos equinos contra el veneno de *Micrurus sp.* producido por Inosan. Lote 3VT01001.

## **6.4 Cirugía**

### **6.4.1 Prequirúrgico**

Los experimentos de FC se realizaron en un quirófano diseñado para este fin. Todos los borregos ayunaron 12 horas, con la finalidad de evitar bronco-aspiración y disminuir la presencia de contenido ruminal durante el procedimiento quirúrgico. Se realizó un examen clínico completo para evaluar su condición de salud y los borregos de los grupos CSL y CLS-R se les administró 1 mL de solución de azul de Evans al 1% en la región dorsal de los metatarsos del miembro pélvico derecho, con la finalidad de visualizar el ducto torácico.

### **6.4.2 Anestesia**

Los fármacos se dosificaron en relación al peso de los animales. En el área de preparación del quirófano, se administró xilacina por vía IM (1 mg/kg). El efecto tranquilizante se manifestó después de 8 ó 10 minutos, lo que permitió la venopunción de la vena radial y la administración de solución salina fisiológica con el fin de mantener una vía venosa permeable durante la administración los anestésicos.

La anestesia se indujo con tiletamina/zolacepam vía IV (10 mg/kg). Una vez relajado el animal, se colocó una sonda endotraqueal conectada a la máquina de anestesia inhalada de isofluorano (1.5 a 2%) vaporizado en O<sub>2</sub> al 100%.

Como analgésico preoperatorio y transoperatorio se utilizó butorfanol (0.1 mg/kg). Posteriormente se realizó la tricotomía de la región ventral cervical y abdominal y el lavado prequirúrgico. Después se colocaron en la mesa de cirugía en posición de decúbito dorsal para realizar el embrocado usando yodo y alcohol. Todos los animales se monitorearon durante el proceso anestésico con un monitor de signos vitales modelo G3 de General Meditech Inc.

### **6.4.3 Registro de signos vitales durante la anestesia**

Durante todo el procedimiento quirúrgico se registraron los valores de frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura y saturación de oxígeno cada 5 minutos.

### **6.4.4 Procedimiento quirúrgico**

Con el fin de evitar timpanización y bronco-aspiración, se practicó una ruminotomía. Para ello, se colocaron los campos quirúrgicos y se realizó una incisión primaria no mayor a 5 cm en la piel de la región ventral. Las capas musculares se separaron por disección roma hasta localizar el peritoneo, el cual se levantó y se sujetó con unas pinzas de Allis para separarlo de las asas intestinales y así evitar lesionarlas. Posteriormente, con tijeras de Mayo, se incidió paralelo a la incisión primaria, para ingresar a la cavidad abdominal. El paso siguiente consistió en localizar y exteriorizar el rumen. Se colocaron compresas humedecidas con solución salina fisiológica para evitar la deshidratación del tejido, se realizó un corte de 3 a 5 mm, se vació el rumen y se insertó una manguera de silicón de media pulgada que se fijó con uno o dos puntos de sutura.

Para tener una vía de colección de orina, se colocó una cánula en la vejiga utilizando un procedimiento similar al descrito para la ruminotomía pero accediendo directamente a la vejiga urinaria.

Para tomar muestras de sangre se colocó una cánula permanente en la vena yugular derecha acoplada a una llave de tres vías, que se fijó con uno o dos puntos de sutura que permitió la colecta de muestras en los tiempos descritos.

En los borregos en los que analizó la linfa (grupos CSL y CSL-R), se realizó una disección del ducto torácico a la altura de la vena yugular derecha y del inicio de la primer costilla. El abordaje se realizó por la línea media, se disectaron los músculos cervicales hasta encontrar la región ventral de la vena yugular externa y la porción final del ducto torácico, que se observaba de color azul por efecto del Azul de Evans administrado con anterioridad. Una vez localizado el ducto torácico se colocó un

catéter venoso con aguja 22 angiocath de BD<sup>®</sup>, que se fijó con suturas, se inmovilizó con pegamento instantáneo de cianoacrilato marca Kolaloka<sup>®</sup> y se conectó a una sonda colectora acoplada a tubos Falcon<sup>®</sup> de 15 mL.

### **6.5 Farmacocinética del veneno administrado por vía intravenosa**

Para analizar la distribución y depuración del veneno en sangre se constituyó el grupo CIS (Coral Intravenoso Sangre). El grupo se conformó por cuatro borregos hembra de 42, 50, 60 y 40 kg de peso. A los dos primeros borregos se les administró 1 mg de veneno en bolo vía IV, en la vena radial. Sin embargo se observó una hipotensión severa dentro de las dos primeras horas, por lo que, se decidió disminuir la dosis a 0.5 mg en los dos borregos restantes.

### **6.6 Farmacocinética del veneno administrado por vía subcutánea**

El segundo grupo de borregos se denominó CSS (Coral Subcutáneo Sangre) y se planteó con el fin de analizar la absorción en la sangre desde el sitio de inoculación. Este grupo se conformó por cuatro borregos, dos machos de 40 y 41 kg de peso y dos hembras de 52 y 36 kg de peso. A cada borrego se le administraron 5 mg de veneno vía SC, en la región dorsal de los metatarsos del miembro pélvico derecho.

### **6.7 Absorción linfática**

El tercer grupo se denominó CSL (Coral Subcutáneo Linfa) y se planteó con el fin de analizar la participación del sistema linfático en la absorción del veneno desde el sitio de inoculación. Este grupo estuvo conformado por cuatro borregos, dos hembras de 45 kg y dos machos de 55 kg. A cada uno se le administraron 5 mg de veneno vía SC en la región dorsal de los metatarsos del miembro pélvico derecho, y a diferencia de los grupos anteriores, en este grupo se tomaron muestras de linfa. Cada 15 minutos, se estimuló el drenaje linfático de la zona de inoculación, con ejercicios de flexo-extensión durante 5 minutos en miembro pélvico derecho.

### **6.8 Efecto del antiveneno en la farmacocinética de veneno**

Con el fin de analizar el efecto del AV en la cinética de envenenamiento en sangre y linfa, se diseñaron dos variantes de los grupos experimentales envenenados vía SC CSS y CSL. A estos grupos se les administró un bolo de AV vía IV dos horas después del veneno. La dosis de AV se calculó en función de la capacidad neutralizante, buscando neutralizar al rededor de 1,900 Dosis Letales Medias (DL<sub>50</sub>). Este cálculo, se hizo en función de la dosis que se administra en casos clínicos en Estados Unidos, donde se administran 5 viales de NACSAV<sup>®</sup> (North American Coral Snake Antivenin producido por Wyeth) con capacidad de neutralizar 1,890 DL<sub>50</sub> (Datos determinados por Carlos Olvera).

Al primer grupo experimental rescatado con AV se denominó CSS-R (Coral Subcutáneo Sangre – Rescate) conformado por cuatro borregos macho de 45, 56 y dos de 55 kg de peso. Al grupo donde se tomaron muestras de linfa se denominó CSL-R (Coral Subcutáneo Linfa – Rescate) y se conformó por cuatro borregos hembra de 46, 62, 60 y 72 kg de peso.

### **6.9 Farmacocinética del antiveneno**

Para analizar la FC del AV se utilizaron borregos sin anestésiar ni intervención quirúrgica, lo que permitió un análisis cinético de días. Este grupo se conformó por dos borregos hembra de 45 Kg y dos borregos macho de 55 kg de peso, a los que se les administró 1 vial de Coralmyn<sup>®</sup> vía IV en la vena yugular. A este grupo se le denominó AvIS (AV Intravenoso Sangre).

Los AVs utilizados fueron donados por convenio, sin embargo nos proporcionaron viales de distintos lotes, por lo que la cantidad de proteína por dosis fue distinta en algunos borregos, como se presenta en la Tabla 5.

**Tabla 5. Dosis de AV administrada a cada borrego.**

grupo experimental	borrego	AV (lote)	potencia neutralizante [DL50/vial]	proteína por vial [mg/vial]	No. de viales administrados	Total de DL50's administradas	proteína administrada [mg]
AvIS	a, b, c, d	Coralmyrn® B-9G-12	1,083.8	133	1	1,083.8	133
CSS-R*	a, b, c, d	Coralmyrn® B-8D-04	231	180	9	2,079	1,620
CSL-R*	d, e	Coralmyrn® B-9G-12	1,083.8	133	2	2,167.6	266
	g, h	INA-2013-BB-IND 13926	559.2	171.5	4	2,236.8	686

\*El AV administrado tiene la capacidad de neutralizar equivalentes al de 5 viales de NACSAV® , es decir, 1900 DL<sub>50</sub>'s

## **6.10 Colecta de muestras**

### **6.10.1 Sangre**

Cada muestra consistió en 6 mL de sangre, que se tomaron con una jeringa conectada a la llave de tres vías. Las muestras de sangre se recibieron en tubos BD Vacutainer® de tapa roja sin anticoagulante.

Para tener mayor detalle en los primeros minutos de la cinética, se diseñó un esquema de muestreo, en donde, las primeras muestras se tomaron de manera frecuente. En la Tabla 6 se describe el esquema de muestreo utilizado en los grupos experimentales CIS, CSS y CSL.

**Tabla 6. Esquema de muestreo de sangre para los grupos CIS, CSS y CSL**

Intervalo	Frecuencia de muestreo	Tiempo de muestreo	No. de muestras
Basal	Muestra única	Antes de inyectar el veneno	1
<i>Después de inyectar el veneno</i>			
0-10 minutos	Cada 2.5 minutos	2', 5', 7', 10'	4
11-60 minutos	Cada 5 minutos	15', 20', 25', 30', 35', 40', 45', 50', 55', 60'	10
61 – 120 minutos	Cada 15 minutos	75', 90', 105', 120'	4
120 – 360 minutos	Cada 20 minutos	140', 160', 180', 200', 220', 240', 260', 280', 300', 320', 340', 360'	12

El esquema que se siguió para el grupo de rescate CSS-R se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7. Esquema de muestreo de sangre para el grupo CSS-R**

Intervalo	Frecuencia de muestreo	Tiempo de muestreo	No. de muestras
Basal	Muestra única	Antes de inyectar el veneno	1
<i>Después de inyectar el veneno</i>			
0-10 minutos	Cada 2.5 minutos	2', 5', 7', 10'	4
11-60 minutos	Cada 5 minutos	15', 20', 25', 30', 35', 40', 45', 50', 55', 60'	10
61 – 120 minutos	Cada 15 minutos	75', 90', 105', 120'	4
<i>Después de inyectar AV</i>			
121 – 360 minutos	Cada 20 minutos	140', 160', 180', 200', 220', 240', 260', 280', 300', 320', 340', 360'	12

Este esquema se modificó para el grupo CSL-R, para seguir la FC del AV con mayor detalle en los primeros minutos, como se describe en la Tabla 8.

Tabla 8. Esquema de muestreo de sangre para el grupo CSL-R

Intervalo	Frecuencia de muestreo	Tiempo de muestreo	No. de muestras
Basal	Muestra única	Antes de inyectar el veneno	1
<i>Después de inyectar el veneno</i>			
0 - 10 minutos	Cada 2.5 minutos	2', 5', 7', 10'	4
11 – 60 minutos	Cada 5 minutos	15', 20', 25', 30', 35', 40', 45', 50', 55', 60'	10
61 – 120 minutos	Cada 15 minutos	75', 90', 105', 120'	4
<i>Después de inyectar AV</i>			
121-130 minutos	Cada 2 minutos	122', 125', 127', 130'	4
131-180 minutos	Cada 5 minutos	135', 140', 145', 150', 155', 160', 165', 170', 175', 180'	10
181 – 240 minutos	Cada 15 minutos	195', 210', 225', 240'	4
241 – 360 minutos	Cada 20 minutos	260', 280', 300', 320', 340', 360'	6

Como se mencionó anteriormente, el grupo AvIS estuvo bajo monitoreo durante días, ya que los animales de este grupo no recibieron veneno, lo que permitió que el experimento pudiera hacerse sin anestesia. En la Tabla 9 se muestra el esquema de muestreo utilizado en este grupo.

Tabla 9. Esquema de muestreo de sangre para el grupo AvIS

Intervalo	Frecuencia de muestreo	Tiempo de muestreo	No. de muestras
Basal	Muestra única	Antes de inyectar el veneno	1
<i>Después de inyectar el AV</i>			
0 - 30 minutos	Cada 5 minutos	5', 10', 15', 20', 25', 30'	6
31 – 60 minutos	Cada 10 minutos	40', 50', 60'	3
1ª – 4ª hora	Cada 30 minutos	90', 120', 150', 180', 210', 240'	6
4ª - 14ª hora	Cada 2 horas	4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 14h	6
2º - 15º día	1 cada día	2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d, 9d, 10d, 11d, 12d, 13d, 14d, 15d	14

### 6.10.2 Linfa

Las muestras de linfa se colectaron del ducto torácico canulado, de manera continua en tubos Falcon® de 15 mL estériles. Cada 15 mL se cambió el tubo colector



y registró el tiempo de cada cambio. En algunos momentos el flujo de linfa en la canula conectada al ducto torácico disminuyó en el grupo CSL-R, por lo que el esquema se modificó, cambiando los tubos colectores cada 5 minutos y registrando el volumen de la muestra. De cada tubo se guardó una alícuota de 2 mL en tubos Eppendorff® estériles.

### **6.10.3 Piel**

Se tomaron muestras de piel de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, del sitio de inoculación. Cada muestra se pesó y se maceró con polvo de cuarzo, como material abrasivo, y solución vehículo (50 mM Tris/HCl pH 8; 0.5 M NaCl; 1 mg/mL gelatina, 0.05% Tween 20). El macerado se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. El precipitado se volvió a macerar y centrifugar como se describió anteriormente, con el objetivo de optimizar la extracción. Este proceso se repitió cinco veces en cada muestra de tejido. En total se utilizaron 5 mL de solución vehículo/g de tejido en cada muestra. En el grupo CSL-R se muestreó el tejido conjuntivo del miembro pélvico y se procesó de la misma manera.

### **6.10.4 Órganos**

Se extrajeron corazón, pulmones, riñones, hígado y bazo de cada borrego. Cada órgano se pesó y se molió en una licuadora marca Oster. Del molido, se tomó un gramo de cada órgano y se homogenizó con solución vehículo (50 mM Tris/HCl pH 8; 0.5 M NaCl; 1 mg/mL gelatina, 0.05% Tween 20) en un homogeneizador de vidrio, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

## **6.11 Procesamiento de muestras**

En el caso de la sangre, las muestras se dejaron coagular a temperatura ambiente, una vez formado y contraído el coágulo, el suero se centrifugó y se guardó en tubos estériles.

Para deslipidizar el suero y la linfa, cada muestra se mezcló con cloroformo en relación 2:1 (muestra : cloroformo) , en un mezclador de sangre oscilatorio

GyroMini™ de Labnet International, Inc. Pasados 15 minutos, cada muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos, y se recuperó la muestra (fase acuosa) con una pipeta Pasteur de vidrio. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis.

### **6.12 Detección y cuantificación de veneno**

Para la detección y cuantificación de veneno en las muestras, se desarrolló un inmunoensayo de ELISA tipo sándwich, en microplacas de 96 pozos MaxiSorp™ marca NUNC, capaz de detectar y cuantificar todos los componentes de proteicos del veneno.

El ensayo mostró un Límite Mínimo de Detección (LLD) de  $1.6 \pm 0.5$  ng/mL y un Límite Mínimo de Cuantificación (LLQ) de  $2 \pm 0.9$  ng/mL.

Como anticuerpo de captura, se utilizaron IgGs inmunopurificadas de conejo hiperinmunizado con veneno de *Micrurus fulvius* a una concentración de 5 mcg/mL en solución de sensibilizado (100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5). Las placas se bloquearon con solución de bloqueo (5 mg/mL de gelatina; 50 mM Tris/HCl pH 8 y 0.2% Tween 20). Como anticuerpo de detección, se utilizó el mismo anticuerpo de captura pero biotinado con NHS-Biotina de Pierce, a una concentración de 5 mcg/mL en solución vehículo (50 mM Tris/HCl pH 8; 0.5 M NaCl; 1 mg/mL gelatina y 0.05 % Tween 20) y posteriormente, estreptavidina-HRP de Sigma, a una concentración de 1 ng/mL en solución vehículo. Para revelar se utilizó ABTS de Research Organics a una concentración de 0.5 mg/mL en buffer para ABTS y una solución de SDS 5% para detener la reacción. La absorbancia se cuantificó en un lector de microplacas Sunrise™ de Tecan, a una  $\lambda=405$  nm.

En cada placa se realizó una curva estándar por duplicado con 11 diluciones seriadas 1:2 partiendo de 300 ng/mL de veneno y 5 muestras con dilución inicial 1:2 y 12 diluciones seriadas 1:2. Los datos de  $A_{405nm}$  de cada muestra se interpolaron en la curva estándar de la misma placa y se promediaron las concentraciones de cada muestra con un  $CV \leq 20\%$ . es decir, las que entraban en la parte más lineal de la curva sigmoide.

En el Apéndice I se detallan los métodos utilizados para producir los anticuerpos utilizados en el ELISA.

### 6.13 Detección y cuantificación del antiveneno

Para la detección y cuantificación de AV en las muestras, se desarrollaron ELISAs tipo sándwich. Se utilizaron microplacas de 96 pozos MaxiSorp™ marca NUNC. Como anticuerpo de captura, se utilizaron IgGs inmunopurificadas de borrego hiperinmunizado con F(ab)<sub>2</sub> a una concentración de 5 mcg/mL; como anticuerpo de detección, se utilizó el mismo anticuerpo de captura pero conjugado con HRP, a una concentración de 2 mcg/mL. Para revelar se utilizó ABTS y SDS 5% para detener la reacción. La absorbancia se cuantificó en un lector de microplacas Sunrise™ de Tecan, a una  $\lambda=405$  nm.

En cada placa se realizó una curva estándar por duplicado con 11 diluciones seriadas 1:2 partiendo de 3 mcg/mL de AV y 6 muestras con dilución inicial 1:20 y 12 diluciones seriadas 1:2. Los datos de  $A_{405nm}$  de cada muestra se interpolaron en la curva estándar de la misma placa y se promediaron las concentraciones con CV  $\leq$  20%.

### 6.14 Análisis farmacocinético no compartamental

El perfil cinético de la concentración de veneno en suero ( $C_s$ ) en función del tiempo ( $t$ ) se ajustó a un decaimiento mono-exponencial (ec. 1) para calcular la concentración máxima en suero ( $C_{smax}$ ) cuando el veneno se administró vía IV. También se calculó el valor de  $C_s$  cuando  $t=0$ .

$$C_s(t) = C_{smax} * e^{-kt} \quad (1)$$

Para evaluar la distribución inicial del veneno en el organismo cuando se administró vía IV, se calculó el volumen de distribución ( $V_D$ ) con la ecuación 2:

$$V_D = \frac{D_{I.V.}}{C_{smax}} \quad (2)$$

Los parámetros FCs restantes se estimaron usando un modelo no compartamental.

La vida media terminal para las cinéticas SC ( $t_{1/2}$ ) se estimó usando la constante de velocidad terminal ( $\lambda_z$ )

$$t_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z \quad (3)$$

El área bajo la curva (AUC) refleja la cantidad total de veneno intacto que alcanza circulación sistémica. Este parámetro, al igual que el área bajo la curva de primer momento (AUMC) se estimaron integrando las cinéticas con el método del trapecio, como se muestra en las ecuaciones 4 y 5.

$$AUC_{0-t} = \int_0^t C_s dt = \sum_{i=0}^{i=t} \frac{1}{2} \cdot (C_{s_i} - C_{s_{i+1}}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (4)$$

$$AUMC_{0-t} = \int_0^t C_s dt = \sum_{i=0}^{i=t} \frac{1}{6} \cdot (t_{i+1} - t_i) \cdot (t_{i+1}(C_{s_i} + 2C_{s_{i+1}}) + t_i(2C_{s_i} + C_{s_{i+1}})) \quad (5)$$

Para extrapolación a infinito ( $\infty$ ), se utilizó la siguiente fórmula:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty} \quad (6)$$

Donde  $AUC_{t-\infty}$  puede evaluarse usando el último valor de Cs calculado al tiempo  $t$  y la constante de velocidad terminal ( $\lambda_z$ ).

$$AUC_{t-\infty} = C_s(t) / \lambda_z \quad (7)$$

El mismo principio se aplicó para la extrapolación de AUMC:

$$AUMC_{0-\infty} = AUMC_{0-t} + AUMC_{t-\infty} \quad (8)$$

$$AUMC_{t-\infty} = \left( t \cdot Cs(t) / \lambda_z \right) + \left( Cs(t) / \lambda_z \right) \quad (9)$$

La depuración (CL) se refiere a la eliminación irreversible del veneno de circulación sistémica, e indica el volumen de suero que queda depurado por minuto. Se calculó de la siguiente manera:

$$CL = D_{i.v.} / AUC_{i.v.} \quad (10)$$

La biodisponibilidad (F), es la fracción de la dosis administrada vía SC que alcanza la circulación sistémica y se calculó con la ecuación 11.

$$F = AUC_{s.c.} \cdot D_{i.v.} / AUC_{i.v.} \cdot D_{s.c.} \quad (11)$$

El tiempo medio de residencia (MRT) se refiere al tiempo promedio en que el veneno permanece en el organismo y está definido por la siguiente ecuación:

$$MRT = AUMC / AUC \quad (12)$$

El tiempo medio de absorción (MAT) se refiere al tiempo promedio que el veneno tarda en llegar a circulación sistémica desde el sitio de inoculación, cuando se administra vía extravascular.

$$MAT = MRT_{s.c.} - MRT_{i.v.} \quad (13)$$

El volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) se refiere al volumen de distribución aparente cuando la curva de concentración sérica de veneno vs. tiempo alcanza el equilibrio.

$$V_{ss} = CL \cdot MRT \quad (14)$$

El tiempo máximo ( $t_{max}$ ), que se refiere al tiempo al que se alcanza la concentración máxima ( $C_{s_{max}}$ ) y la concentración de veneno en suero al final de la cinética ( $C_z$ ), se tomaron directamente de los datos experimentales.

Las comparaciones estadísticas entre grupos experimentales se hicieron usando un análisis ANOVA monolateral y para comparar entre cada uno de los grupos se utilizó la prueba de Tukey.

La fracción de la dosis de veneno absorbida por linfa (F), se calculó como el producto de la concentración de veneno y el volumen de la muestra y se expresó como porcentaje de la dosis administrada vía SC. El porcentaje acumulado transportado vía linfática se obtuvo sumando los porcentajes de cada intervalo. Los porcentajes totales de veneno absorbido en los grupos CSL y CSL-R se calcularon sumando lo absorbido por linfa con lo que se absorbió por sangre (F).

Los cálculos para la FC de AV se hicieron siguiendo la misma metodología.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Cinética IV del veneno de *Micrurus fulvius*

Para analizar la distribución y eliminación del veneno en sangre se realizó una cinética IV de veneno de *M. fulvius* (grupo CIS). En la Figura 2 se muestra la cinética que siguió el veneno en suero durante seis horas, después de administrarlo vía IV.

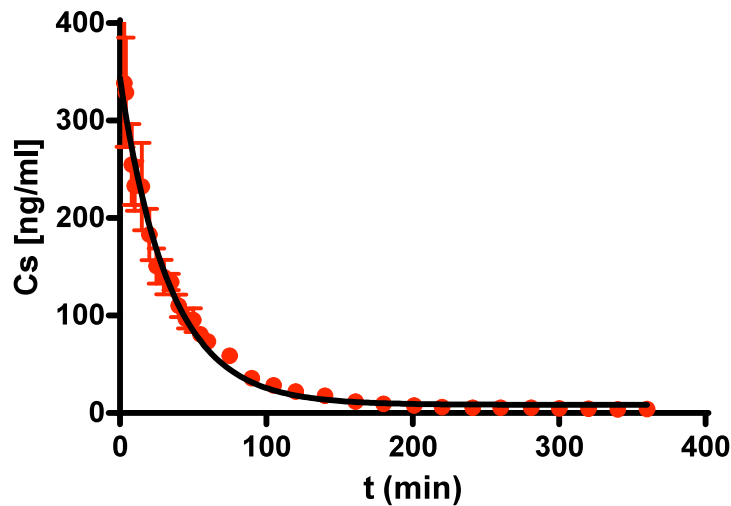


Figura 7. FC de veneno administrado vía I.V.

Cinética de la concentración de veneno en suero administrado vía I.V. (CIS), después de corregir los datos a una dosis de 1 mg. Los símbolos (●) representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$  y la línea negra representa el ajuste a decaimiento mono-exponencial.

Cuando el veneno se administró vía IV (Figura 7), se observó que después de 6 horas, la concentración de veneno ( $C_z$ ) decayó 99.5%, con respecto a la concentración inicial ( $C_{max}$ ).

La cinética se ajustó a un decaimiento mono-exponencial, descrito por la ecuación:

$$C_s = C_{s^0} * e^{-kt}$$

Donde la concentración sérica al tiempo 0 ( $C_s^0$ ) se calculó de  $339 \pm 65$  ng/mL y  $k$  de  $0.029 \pm 0.004$  min<sup>-1</sup>; con una  $R^2$  de  $0.9794 \pm 0.006$ . El tiempo de vida media se calculó de 25 minutos y el tiempo de residencia promedio (MRT) de 75 min.

En general la cinética de proteínas administradas vía IV, suele presentar un decaimiento bi-exponencial, dado por una distribución de las proteínas desde sistema vascular hacia órganos altamente perfundidos, seguido de una redistribución de las proteínas desde tejidos hacia sistema vascular y su eliminación. La discordancia entre el comportamiento cinético esperado y el obtenido experimentalmente, puede deberse a la duración del experimento, ya que al ser de sólo 6 horas, probablemente no se alcanzó a ver la segunda fase.

Se calculó un volumen de distribución inicial ( $V_D$ ) de 3.2 L, cercano al 7% del peso de los individuos (los borregos). Estos resultados eran esperados, debido a que de manera general, las proteínas administradas vía IV se distribuyen en un volumen poco mayor al volumen plasmático (4-11% del peso corporal) ya que alcanzan casi instantáneamente el espacio vascular y espacio intersticial de órganos altamente perfundidos y con alta permeabilidad capilar, como son el hígado y los riñones [Tang y Meibohm, 2006]. Estos resultados muestran que no existe una afinidad inespecífica e importante por proteínas plasmáticas, eritrocitos o algún tejido del sistema vascular, ya que de ser así, la concentración del veneno en suero sería menor, y daría como resultado un volumen de distribución mayor al volumen plasmático [Tang y Meibohm, 2006].

Al alcanzar el equilibrio, el volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) incrementó a 5.7 L, equivalente al 12%. En general, en  $V_{ss}$  no suele ser mayor al doble de  $V_c$ , ya que las proteínas tienen una movilidad limitada a través de las biomembranas [Tang y Meibohm, 2006]. La internalización mediada por receptores da lugar a concentraciones efectivas en el tejido blanco, a pesar de no reflejarse en los valores de  $V_{ss}$  [Tang y Meibohm, 2006]. Lo que es el caso, ya que las toxinas del veneno actúan en la membrana del botón presináptico de manera muy específica [Rossetto y Montecucco, 2008].

La depuración de sangre (CL) se calculó en  $74 \pm 6$  mL/min. Con valores menores al 1% de la dosis en orina. Se reporta que proteínas de 16 kDa se eliminan

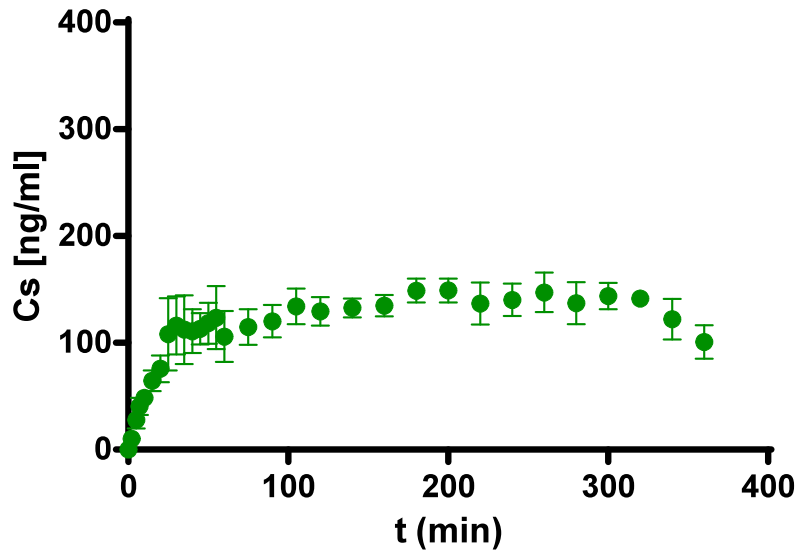


por filtración glomerular, seguido de metabolismo (degradación) renal [Tang y Meibohm, 2006]. Los factores que determinan la velocidad y mecanismo de depuración de proteínas incluyen tamaño molecular, carga global, hidrosolubilidad, grupos funcionales, estructura terciaria y cuaternaria y propensión a agregación, por lo que es un parámetro difícil de comparar con lo reportado para otras proteínas. Sin embargo, de manera general, las proteínas son eliminadas por las mismas rutas catabólicas de proteínas endógenas, lo que explicaría por qué no encontramos cantidades importantes del veneno en orina (Tabla 1).

La FC del veneno de *M fulvius*, nunca había sido reportada, por lo que no se cuenta con parámetros comparables. Audebert *et al.*, 1994 reportaron la farmacocinética IV e IM en conejos, de veneno de *Vipera aspis*, (cuyo veneno incluye proteínas en un rango de 1 a 60 kDa), observaron un decaimiento bi-exponencial con  $t_{1/2} = 42$  min y 12 h, y un CL muy cercano al observado en este trabajo, sin embargo, el  $V_{ss}$  es mayor al volumen sanguíneo, por lo que los autores sugieren afinidad a algunos tejidos. Este ejemplo ilustra que diferencias entre las distintas toxinas que componen a los venenos, hacen que las comparaciones no sean válidas, ya que propiedades como el peso molecular y la actividad biológica dan lugar a perfiles FCs muy distintos, aunado a las variaciones propias del modelo animal utilizado.

## **7.2 Absorción del veneno administrado vía SC**

Para analizar la absorción del veneno desde el sitio de inoculación, se administraron 5 mg de veneno vía SC. En la Figura 8 se muestra la cinética resultante.



**Figura 8. FC de veneno en suero administrado vía SC**

Cinética de la concentración de veneno en suero después de administrar 5 mg de veneno vía SC (CSS). Los símbolos (●) representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

Al administrar el veneno vía SC (grupo CSS), se observa una modificación importante en la cinética del veneno en sangre (Figura 8), en comparación con lo observado vía IV (Figura 7). A lo largo seis horas, la concentración se mantiene casi constante, disminuyendo sólo en un 35% con respecto a  $C_{max}$ , mostrando un estado estacionario a lo largo de 6 horas. El MRT aumentó 6 veces con respecto a la administración IV y el tiempo de absorción se estimó de casi 7 horas. El volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) se calculó en 27 L, equivalentes a 66% del peso corporal, incrementando en un 19% con respecto a la administración IV, mientras CL no se modificó con respecto a la administración IV. Seis horas después de la inoculación, se alcanzó una biodisponibilidad (F) de  $60 \pm 5\%$  de la dosis administrada, mostrando una absorción incompleta, al menos en el periodo de observación. Dado que no se observa la fase de eliminación, podemos suponer que en más tiempo la biodisponibilidad puede aumentar, aunque es difícil de estimar, ya que en la administración SC se reporta una biodisponibilidad variable y casi siempre incompleta.

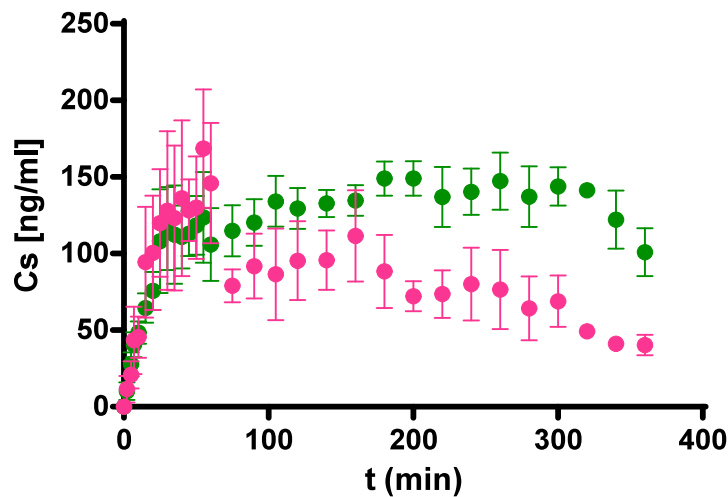
### **7.3 Participación del sistema linfático en el proceso de absorción**

Para analizar la absorción por sangre y por linfa de manera independiente, se drenó la linfa de los borregos y simultáneamente se tomaron muestras de sangre. Este grupo se denominó CSL.

En la Figura 9 se muestra un comparativo de la cinética del veneno en sangre con y sin drenaje de linfa, con el objetivo de ver la influencia de la absorción linfática en la FC del veneno.

Ambas cinéticas son muy similares en la primera hora, con concentraciones máximas ( $C_{max}$ ) sin diferencia estadística. Sin embargo la comparación indica que la absorción linfática impacta el perfil cinético del veneno en sangre, manteniendo un estado pseudo-estacionario por mayor tiempo (Figura 9). La concentración al final de la cinética decayó un 66% con respecto a la concentración máxima, en contraste con el 35% calculado sin drenaje linfático.

La biodisponibilidad del veneno en este grupo fue de 45% en sangre, en contraste con el 60% que se observó en el grupo sin drenaje linfático. Los valores de biodisponibilidad no presentan una diferencia estadísticamente significativa, hecho que puede deberse al número de individuos utilizado. No obstante, no se descarta que a tiempos más largos, la diferencia en la biodisponibilidad se vuelva significativa.



**Figura 9. Influencia de la absorción linfática en la FC**

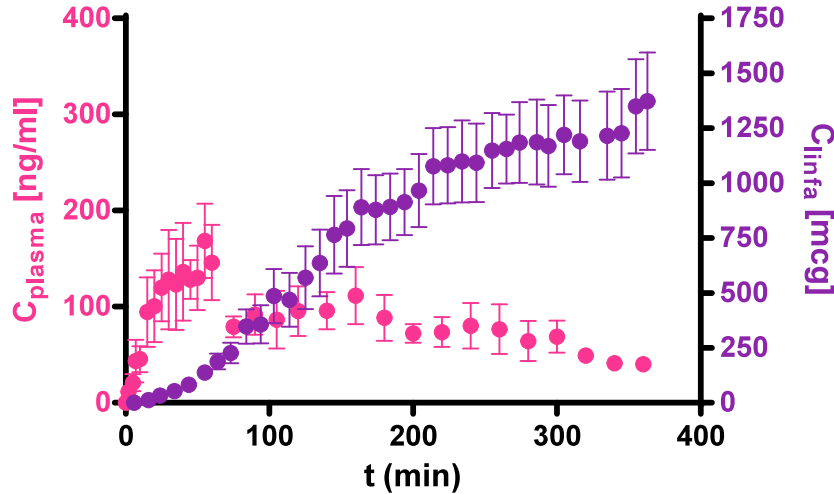
Comparativo de la cinética del veneno de *M. fulvius* en suero, después de administrar 5 mg vía SC en borregos con el conducto torácico canulado (●) (CSL) y sin canulación de linfa (●) (CSS). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$  por grupo.

En este grupo el volumen de linfa drenado fue de  $1.06 \pm 0.06$  L, con un flujo de  $3 \pm 0.22$  mL/min en las seis horas de cirugía, valores que se encuentran dentro de los parámetros normales reportados para borregos anestesiados [Onizuka *et al.*, 1997].

El análisis en linfa muestra que sí hay absorción del veneno por esta vía. El valor de  $C_{max}$  alcanzó  $3,943 \pm 604$  ng/mL (21 veces más que en sangre) y  $C_z$  fue de  $975 \pm 210$  ng/mL (62 veces más que en sangre). La cuantificación global de veneno en linfa fue de  $1.25 \pm 0.15$  mg, equivalentes al  $25 \pm 3$  % de la dosis administrada. Lo anterior equivale al 35% de la dosis absorbida en 6 horas, valor muy cercano al 40% que reporta Supersaxo *et al.* (1990), para proteínas de 13 kDa.

A lo largo de la cinética, las concentraciones de veneno en linfa presentaron un comportamiento de oscilación aleatoria (Ver Apéndice II Figura AII.3.) , debido a que el flujo de linfa es intermitente, gracias a su estructura segmentada que opera de manera peristáltica y unidireccional [Swartz; 2001]. Este comportamiento impide que la linfa que se absorbe desde el sitio de inoculación se homogenice con la linfa que se absorbe de otras regiones anatómicas. Debido a lo anterior, se decidió graficar las cantidades de veneno que se van acumulando en linfa junto con la cinética en sangre.

Las cinéticas se presentan en la Figura 10 y se analiza el comportamiento conjunto ya que ambos procesos ocurren de manera simultánea.



**Figura 10.** PC de veneno en linfa y suero administrado vía SC

Cinética de la concentración de veneno en suero (●) y cantidad de veneno acumulada en linfa (●), después de administrar 5 mg de veneno vía SC en borregos con el ducto torácico canulado (CSL). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

Cuando se analizan ambos procesos de manera simultánea (Figura 10), se observa que la absorción linfática aumenta, mientras que la concentración de veneno en sangre empieza a disminuir. El veneno aparece en linfa 10 minutos después de haber sido inoculado y mantiene una velocidad constante de absorción hasta los primeros 50 minutos, después la velocidad de absorción incrementa sustancialmente. Este comportamiento muestra que la absorción linfática es consecuencia de dos procesos. El primero es el de reabsorción, que se da por el veneno que llegó directamente a sistema vascular, extravasó al líquido intersticial y se reabsorbió por linfa [Aukland y Reed, 1993]. El segundo es la absorción directa desde el sitio de inoculación a través del sistema linfático. El aumento sustancial en las concentraciones y por ende en la velocidad de absorción en la segunda fase indica que este último es el proceso dominante.

En la Tabla 10 se muestran los parámetros FCs calculados para los tres grupos experimentales. Los parámetros se obtuvieron a partir de un análisis no compartamental.

**Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos<sup>a</sup> del veneno administrado vía IV y SC**

	CIS	CSS	CSL
Vía de administración	IV	SC	SC
Dosis (mg)	1	5	5
Cs <sub>max</sub> (ng/mL)	339 (± 65)	181 (± 21)	183 (±36)
C <sub>z</sub> (ng/mL)	1.8 (± 0.1)**	117 (±11)**	62 (±20)**
t <sub>max</sub> (min)	-	162 (± 29)**	43 (±9)**
t <sub>1/2</sub> (min)	25.3 (± 3.2)	261 (± 55)*	306 (±69)*
V <sub>c</sub> (l)	3.2 (± 0.5)	-	-
V <sub>c</sub> (%)	7 (±0.8)	-	-
AUC <sub>0-t</sub> (mcg/mL * min)	13.3 (± 1)	41 (±3.7)*	30.2 (±5.1)*
AUMC <sub>0-t</sub> (mcg/mL * min <sup>2</sup> )	0.74E <sup>3</sup> (±0.06E <sup>3</sup> )	7.4E <sup>3</sup> (±0.9E <sup>3</sup> )	4.6 E <sup>3</sup> (± 0.7E <sup>3</sup> )
CL (mL/min)	74.1 (±6)	67 (± 9)	99 (± 25)
MRT (min)	75 (±7)	457 (± 58)*	433 (±126)*
V <sub>ss</sub> (l)	5.7 (±0.9)	27 (±2)*	36 (± 6)*
V <sub>ss</sub> (%)	12 (±1.8)	66 (±8)*	71(±12)*
MAT (min)	-	393 (±58)	369 (± 126)
F (%) <sup>b</sup>	-	60 (±5)	45 (±8)
Recuperación en linfa (% de la dosis)	-	-	25 (±3)
Flujo linfático (mL/min)	-	-	3 (±2)
Recuperación total (% de la dosis) <sup>c</sup>	-	60 (±5)	69 (±5)
Recuperación en orina (% de la dosis)	0.18 (±0.04)	0.22 (±0.12)	0.12 (±0.1)

<sup>a</sup> Los valores representan el promedio ± SEM

<sup>b</sup> La biodisponibilidad se calculó usando el promedio de Area Bajo la Curva (AUC)<sub>iv</sub>

<sup>c</sup> La recuperación total se calculó para cada individuo y representa la suma de la biodisponibilidad sistémica, el porcentaje de la dosis acumulada en linfa y en orina.

(\*)Diferencia significativa con respecto a CIS ( $\alpha < 0.05$ )

(\*\*) Diferencia significativa entre grupos ( $\alpha < 0.05$ )

Como se observa en el análisis FC (Tabla 10), el valor de CL no muestra diferencias significativas entre los tres grupos, mientras que parámetros como Cz,  $t_{1/2}$ , MRT y Vss aumentan al administrar el veneno vía SC, lo que muestra que el proceso de absorción es un proceso que impacta la exposición al veneno y el tiempo en el que permanece en el organismo, y por lo tanto impacta de manera directa la evolución del envenenamiento. Sin embargo, no fue posible correlacionar sintomatología con cinética del veneno, ya que la anestesia, al igual que el veneno, actúa a nivel neuromuscular.

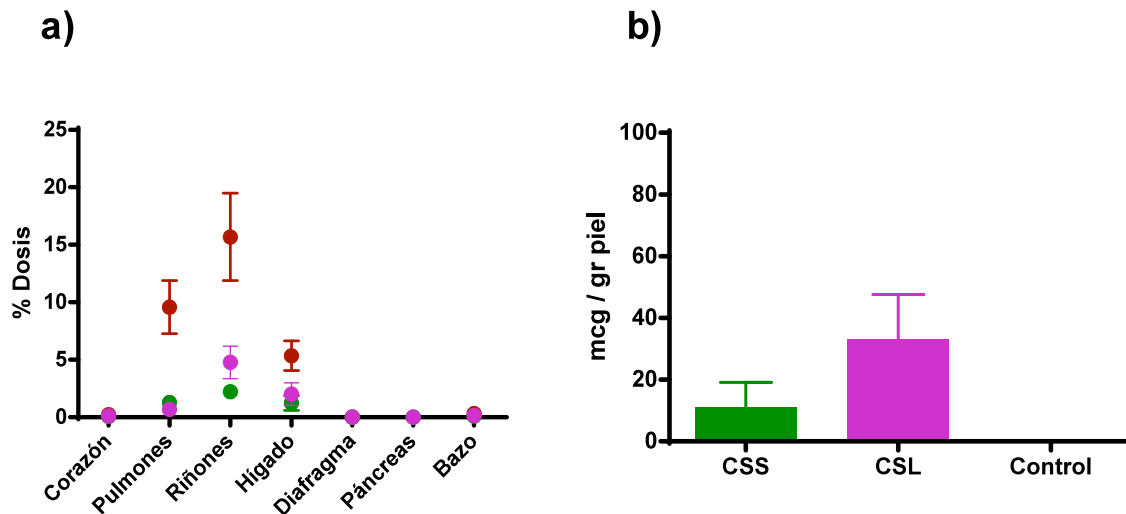
La concentración máxima alcanzada ( $C_{max}$ ) no se ve influenciada por la absorción linfática. Sin embargo, el tiempo en el que se alcanza dicha concentración ( $t_{max}$ ), es mayor cuando no se drena linfa (grupo CSS), mientras que Cz es menor. Estos datos sugieren que el aporte en linfa aumenta la residencia del veneno en sangre. Sin embargo parámetros como AUC, CL, MRT, Vss, MAT y F no muestran una diferencia significativa estadísticamente. Esto puede deberse al número limitado de individuos y desviación de los datos dada principalmente por diferencias en peso, aunque también las diferencias en sexo y edad podrían aumentar la dispersión de los datos. En los demás parámetros cinéticos no se observó diferencia entre los dos grupos (Tabla 10).

No se pudo correlacionar la concentración de veneno con el retardo de la sintomatología en casos clínicos, ya que el veneno llega a sangre desde los primeros minutos, por lo que creemos que el retardo en los síntomas está estrechamente relacionado con los efectos bioquímicos y fisiológicos del veneno y su mecanismo de acción, más que con la concentración plasmática directamente.

#### **7.4 Acumulación del veneno en órganos y en el sitio de inoculación**

Para analizar la distribución del veneno, se cuantificó el veneno remanente después de 6 horas de la inoculación en corazón, riñones, pulmones, hígado, diafragma, páncreas y bazo. La cantidad total de veneno encontrada en cada órgano se representó como un porcentaje de la dosis administrada y los valores se muestran en la Figura 11a. En la Figura 11b se representan gráficamente las concentraciones de

veneno encontradas en el sitio de inoculación y su comparativo con los valores encontrados en la pata contralateral (control). El veneno difundió del sitio de inoculación y no fue posible determinar el área de distribución, impidiendo la cuantificación del porcentaje de dosis retenido en este sitio después 6 horas.



**Figura 11. Veneno en órganos y sitio de inoculación de grupos envenenados.**

a) Cantidad de veneno en los principales órganos en los tres grupos experimentales: CIS (●), CSS (●) y CSL (●). b) Concentración de veneno en la piel próxima en el sitio de inoculación S.C y en la extremidad contra lateral de cada individuo en los grupos CSS (●) y CSL (●). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

Al cuantificar el veneno presente en los principales órganos, observamos una concentración mayor en riñones, hígado y pulmones (Figura 11a).

Los órganos donde se encontró mayor cantidad de veneno fueron los riñones, pulmones e hígado, mientras que en los órganos restantes se encontró una concentración sumamente baja o nula. Lo que concuerda con lo esperado, ya que los riñones junto con el hígado como principales órganos excretores, son los órganos con mayor perfusión y permeabilidad capilar.

La cantidad elevada de veneno en pulmones no era esperada, sin embargo, puede explicarse por la formación de edema pulmonar, debido a la posición en la que



se mantuvo a los borregos durante la cirugía. Este fenómeno pudo impactar el volumen de distribución, sin embargo no se observa ningún efecto importante en los parámetros FCs, como se discutió anteriormente.

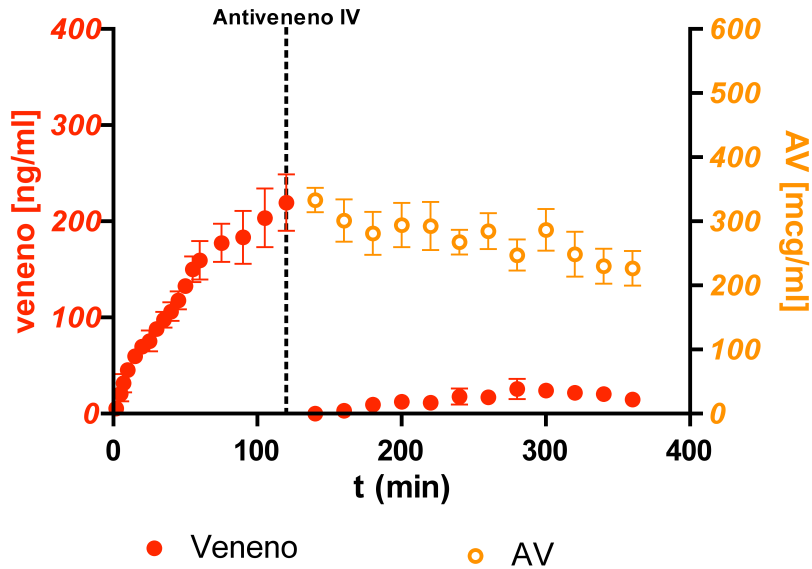
Las concentraciones del veneno encontradas en muestras de piel próximas al sitio de inoculación fueron en promedio, 33 y 98 veces mayores a las encontradas en las extremidades contralaterales de los mismos individuos (Figura 11b). Lo que indica que el veneno es retenido en el sitio de inoculación, que funciona como un depósito, desde donde el veneno se absorbe lentamente, como se ha sugerido para el envenenamiento con otras especies a partir de observaciones clínicas, atribuyendo a este proceso la recurrencia de envenenamiento que se llega a observar, aún después de administrar el AV en pacientes mordidos por algunos vipéridos [Reid y Theakston 1983; Seifert *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 1999; Bush *et al.*, 2013].

Podemos suponer que este fenómeno está dado por la interacción de las proteínas del veneno con componentes de la matriz extracelular, principalmente las PLA<sub>2</sub>, que corresponden al 58% del veneno y tienen un punto isoeléctrico básico [Vergara *et al.*, 2014], por lo que a pH fisiológico presentan una carga positiva, mientras que el ácido hialurónico se encuentra en la matriz extracelular en su forma básica (hialurano) con cargas negativas. El tamaño también es un factor importante que promueve el tiempo de residencia en el espacio SC debido a que la red de componentes funciona como matriz de exclusión molecular. Lo anterior aunado con la poca actividad hialuronidasa que presenta el veneno, explica el tiempo de residencia observado en el sitio de inoculación.

### **7.5 Modificación de la cinética del veneno en presencia de AV**

Con el fin de analizar cómo se modifica la cinética del veneno en presencia del AV, se diseñaron dos grupos experimentales basados en los grupos CSS y CSL. En estos grupos también se administró el veneno vía SC y en uno de ellos se drenó la linfa. A diferencia de los grupos anteriores, a éstos grupos se les administró AV en bolo IV después de 2 horas de envenenamiento, para simular una situación clínica. A estos

grupos se les denominó CSS-R (Coral Subcutáneo Sangre-Rescate), y CSL-R (Coral Subcutáneo Linfa-Rescate) cuando se canuló el conducto torácico para drenar la linfa.



**Figura 12. PC de veneno y AV en suero grupo CSS-R**

Cinética del grupo CSS-R de veneno en sangre después de administrar 5 mg vía SC (●), y de AV (●) administrado en bolo I.V., dos horas después del envenenamiento. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

En la Figura 12 se presenta la cinética del grupo CSS-R, donde se observa que al momento de administrar el AV vía IV, la concentración de veneno en sangre cae a niveles incuantificables, esto es debido a que el ELISA que se utilizó para cuantificar el veneno, solo detecta veneno libre, perdiendo reconocimiento por el veneno acomplexado con AV o modificado estructuralmente, por lo que asumimos que el veneno que cuantificamos es únicamente veneno activo, mientras el AV se mantiene en circulación. La  $C_{max}$  observada fue de  $219 \pm 29$  ng/mL, sin diferencia estadística con el valor observado para los grupos CSS y CSL (sin AV), pero parámetros como AUC, AUMC, MRT, CL y F si se ven disminuidos considerablemente. Al final de la cinética, se observa un ligero incremento de la concentración de veneno ( $C_z = 19 \pm 5$  ng/mL). Análisis posteriores mostraron que este “rebote” final correspondía a proteínas cercanas a los 7 kDa que no son tóxicas y están presentes en el veneno [Vergara *et al.*,

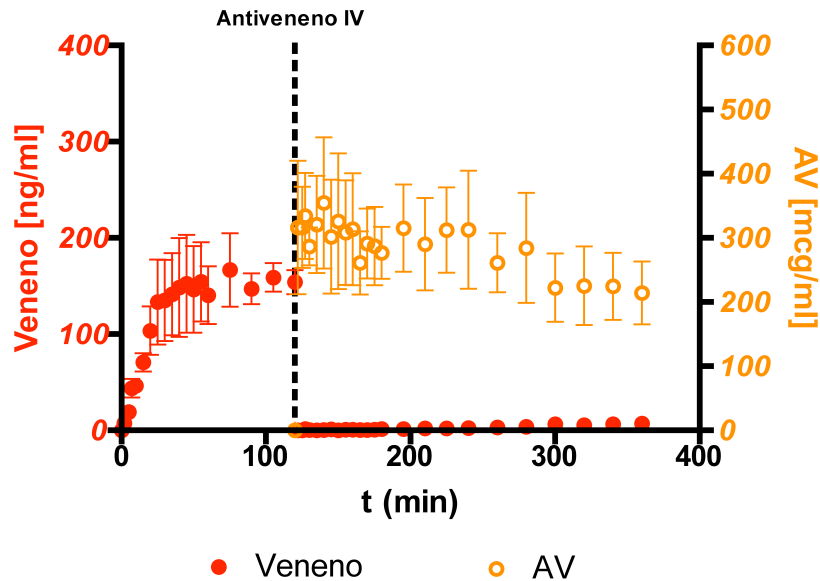
2014]. Estas proteínas son poco inmunogénicas, y por lo tanto, escasamente reconocidas por el AV, pero si son detectadas en el ensayo de ELISA que se utilizó para cuantificar el veneno en las muestras.

Este “rebote” se da porque el veneno se sigue absorbiendo desde el sitio de inoculación, sin embargo, a diferencia de las que se absorbieron previamente, estas ya no encuentran anticuerpos disponibles para formar inmunocomplejos. Esto nos permite ver como los componentes del veneno se van neutralizando al llegar a sangre, conforme se absorben desde el sitio de inoculación. y evidencia la disparidad FC entre el veneno que se absorbe lentamente, y el AV que se administra vía IV, situación que se propone como causa de las recurrencias de envenenamiento que se reportan clínicamente.

Efectos similares del AV sobre la cinética de veneno ya habían sido reportados por Rivière *et al.* en 1997 en conejos envenenados con veneno de *Vipera aspis* administrado vía I.M. Los autores observaron que al administrar en AV vía IV, el veneno ya no era detectable por ELISA, pero si por radioactividad, mientras que el AV se mantenía en circulación. Krifi *et al.*, 2005, observaron el mismo fenómeno al administrar veneno de *Androctonus australis garzonii* vía SC y AV (F(ab')<sub>2</sub>) administrado vía IV, sin embargo, los parámetros FCs del veneno no son comparables ya que el veneno y el modelo animal utilizado son distintos.

## **7.6 Neutralización del veneno absorbido por linfa**

Como se demostró con el grupo CSL, el sistema linfático tiene un papel importante en la absorción del veneno, por lo que se planteó el grupo CSL-R para evaluar si el AV administrado vía IV neutralizaba el veneno absorbido por linfa, que se había administrado vía SC 2 horas antes. En la Figura 13 se muestra la cinética de veneno y AV en sangre.



**Figura 13. Cinética de veneno y AV en suero del grupo CSL-R**

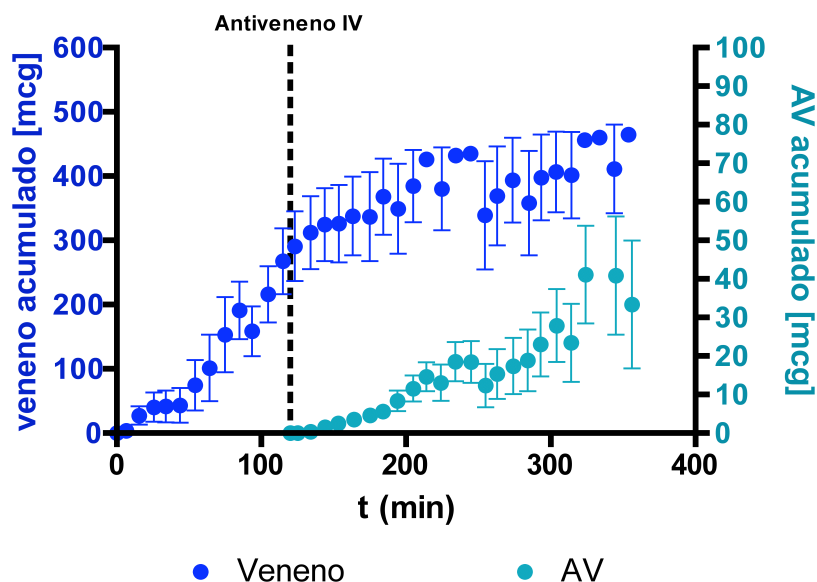
Cinética de veneno en sangre después de administrar 5 mg vía SC (●), y de AV (●) administrado en bolo IV, dos horas después del envenenamiento en borregos canulados del ducto torácico. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

La concentración de veneno en sangre cae a niveles incuantificables momentos después de que se administra el AV vía IV, lo que impactó de manera directa los parámetros de AUC, MRT, CL y F, comparados con el grupo sin AV (CSL), no así  $C_{max}$ . También hubo un ligero “rebote” dado por la reaparición de veneno en sangre ( $C_z = 7.1$  ng/mL). Análisis posteriores mostraron que este rebote correspondía a proteínas cercanas a los 7 kDa que no son tóxicas y están presentes en el veneno [Vergara *et al.*, 2014].

La concentración del AV en sangre, al final del experimento ( $C_z$ ) representó el  $54 \pm 7\%$  de la  $C_{max}$  alcanzada, valor similar al  $68 \pm 6\%$  que se observó en el grupo CSS-R (cuando no se drenó linfa).

En este grupo (CSL-R), el volumen de linfa drenado fue de  $0.78 (\pm 0.2)$  L, a un flujo de  $2.2 (\pm 0.4)$  mL/min. El veneno alcanzó una  $C_{max}$  de  $2,277 (\pm 653)$  ng/mL y la  $C_z$  fue de  $51 (\pm 23)$  ng/mL en este fluido, mientras que para el AV  $C_{max}$  fue de  $95,100 (\pm 28,700)$  ng/mL y  $C_z$  fue de  $57,500 (\pm 14,100)$  ng/mL. Las concentraciones de veneno

y AV, presentaron un comportamiento oscilatorio (ver Apéndice II Figura AII.6.), por lo que, también en este caso, se graficaron las cantidades acumuladas (Figura 14).



**Figura 14.** FC de veneno y AV en linfa del grupo CSL-R

Cantidades acumuladas de veneno (●) y AV (●) en linfa en el grupo de borregos CSL-R. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

Durante las dos primeras horas, se observan dos etapas en la absorción de veneno vía linfática, como se describió en el grupo sin AV (CSL), sin embargo, al administrar el AV, la velocidad de absorción comienza a disminuir, al tiempo que empieza a aparecer AV en linfa (Figura 14).

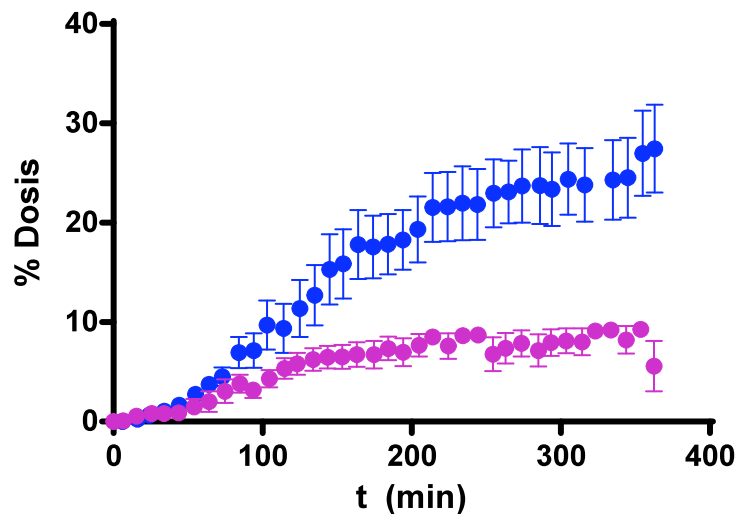
Al final de la cinética, el veneno en linfa decae un 98% con respecto a la  $C_{max}$  observada, en contraste con el grupo sin AV (CSL) que decayó el 75%, debido a que el veneno en linfa es neutralizado paulatinamente, con lo que no alcanza los niveles que alcanzó sin AV (Figura 15).

Esta neutralización se dio gracias a que el 7% de la dosis de AV administrada vía IV, extravasó desde capilares sanguíneos, entró al sistema linfático y fue detectable en linfa 6 minutos después de su administración. Lo que demuestra que el AV se distribuye en el espacio intersticial, a partir de donde es reabsorbido por el sistema

linfático, neutralizando el veneno que se absorbe por vía linfática y no sólo el veneno en circulación sistémica.

Sin embargo, esta neutralización es parcial y paulatina ya que no alcanza a neutralizar al veneno completamente ( $C_z = 53 \text{ ng/mL}$ ), al contrario de lo que se observa en sangre, donde la neutralización es total e inmediata. Por lo tanto, cierta cantidad de veneno sigue llegando a circulación sistémica a través del sistema linfático sin ser neutralizado.

Esta circulación de anticuerpos ya había sido reportada en ratas para Trastuzumab, un anticuerpo (IgG) usado contra cáncer de mama [Dahlberg *et al.* 2013].



**Figura 15. Comparativo de FC de veneno en linfa con y sin AV**

Comparativo de la cinética del veneno de *M. fulvius* en linfa, administrado vía SC en borregos. con AV (●) y sin AV (●). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$  por grupo.

**Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos<sup>a</sup> del veneno y AV en los grupos “rescate”**

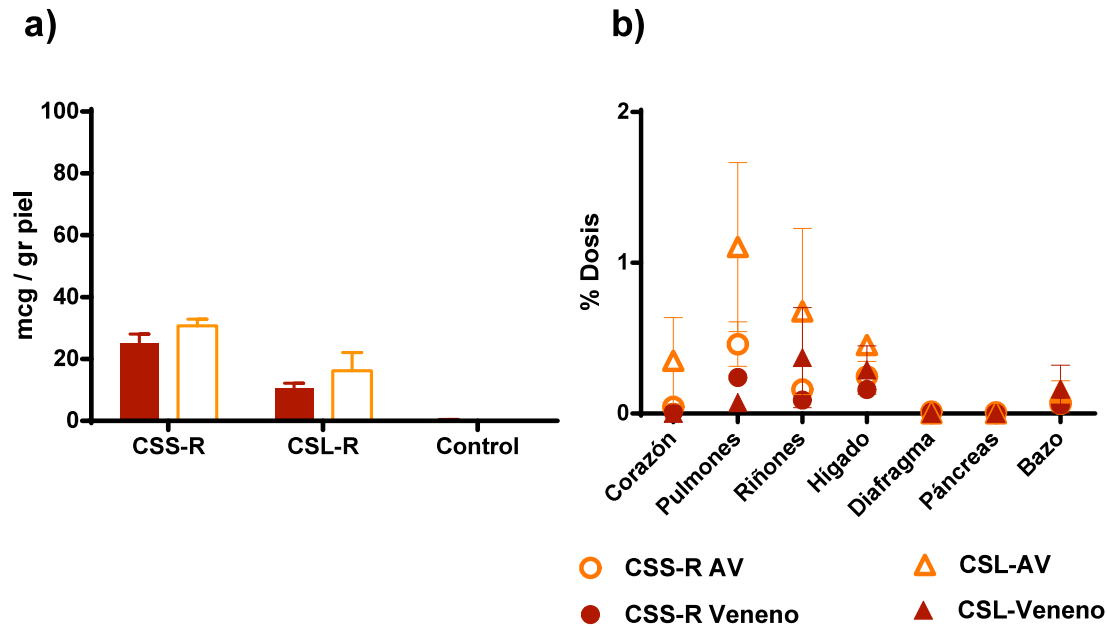
	CSS-R		CSL-R	
	Veneno	AV	Veneno	AV
C <sub>max</sub> (ng/mL)	219 (±29)	333 (± 19)	192 (± 8.2)	407 (±87)
t <sub>max</sub> (min)	120	-	96 (± 4.3)	-
C <sub>z</sub> (ng/mL)	19 (±5)	227 (±27)	7.1 (±3.5)	214 (±49)
AUC <sub>0-t</sub> (mcg/mL*min)	21.9 (±2.4)	63.6 (±5.4)	16.3 (±1.2)	65.7 (±14.9)
AUMC <sub>0-t</sub> (mcg/mL*min <sup>2</sup> )	2.4E <sup>3</sup> (±0.4E <sup>3</sup> )	7.6E <sup>3</sup> (±0.7E <sup>3</sup> )	1.2E <sup>3</sup> (±0.18E <sup>3</sup> )	7.4E <sup>3</sup> (±1.7E <sup>3</sup> )
CL (mL/min)	236 (±26)	26 (±2)	334 (±32)	8.3 (±1.6)
MRT (min)	108 (±8)	119 (±3)	77 (±5.3)	113 (±3.1)
V <sub>ss</sub> (l)	25 (±2)	3.1 (±0.2)	26 (± 1)	0.9 (±0.2)
V <sub>ss</sub> (%)	48 (±3)	6 (±0.1)	42 (±3)	2 (± 0.5)
F (%) <sup>a</sup>	31 (±3)	-	24 (±2)	-

<sup>a</sup> Los valores representan el promedio ± SEM

<sup>b</sup> La biodisponibilidad se calculó usando el promedio de Área Bajo la Curva (AUC)<sub>iv</sub>

### 7.7 Neutralización del veneno en el sitio de inoculación

En el grupo CSS-R, la cuantificación del veneno en la piel próxima al sitio de inoculación, muestra una concentración 83 veces mayor a la encontrada en la extremidad contralateral, y 37 veces mayor en el grupo CSL-R (Figura 16a), sin diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha > 0.05$ ) con las concentraciones observadas en los borregos envenenados (33 veces mayor que el control, para CSS y 98 para CSL).



**Figura 16. Veneno y AV en el sitio de inoculación y en órganos**

a) Porcentaje de la dosis absorbida que se encontró de veneno (●) y AV (●) en los principales órganos analizados post mortem en los borregos de los grupos CSS-R y CSL-R. b) Concentraciones de veneno (●) y AV (●) encontradas en la piel próxima al sitio de inoculación, analizadas *post mortem*. Como control se midieron concentraciones de veneno y AV en el mismo tejido de la extremidad contralateral. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de  $n=4$ .

Estos resultados demuestran, que al menos cuatro horas después de la administración de AV, no se alcanza a neutralizar el veneno retenido en el sitio de inoculación. Sin embargo, se encontraron 30.7 mcg de AV/g de tejido en este sitio.

El que haya veneno activo al mismo tiempo que AV, muestra que existe una cantidad pequeña de AV que llega a este tejido, pero no es suficiente para una neutralización significativa, lo que provoca que el veneno que está retenido cerca del sitio de inoculación siga siendo activo y con el potencial de absorberse hasta sangre. Por lo tanto, a pesar de la administración de AV, el sitio de inoculación sigue funcionando como un depósito de liberación prolongada, como fue mencionado anteriormente. Este hecho se da ya que las proteínas tienen baja permeabilidad a través de membranas, debido, entre otros factores, a su peso molecular, lo que hace que la difusión del AV (100 kDa) a tejidos con baja perfusión sea limitada.



Los resultados observados son consistentes con observaciones en pacientes envenenados por vipéridos y tratados con AVs del tipo Fab, cuyo peso molecular es menor (la mitad) al de AVs del tipo F(ab')<sub>2</sub> y por ende, se esperaría mayor permeabilidad en membranas, sin embargo no es así. Pacientes mordidos por *Echis carinatus*, presentaron altas concentraciones de veneno en el aspirado de ámpulas próximas al sitio de inoculación, aun cuando ya no se detectó veneno en suero, debido a la administración del AV correspondiente [Reid y Theakston, 1983]. Boyer *et al.* en 1999, caracterizaron la recurrencia o persistencia de coagulopatías en pacientes envenenados por *Crotalus*, y sugieren que la recurrencia de envenenamiento se debe, entre otras cosas, a la incapacidad del AV por llegar al sitio de inoculación y neutralizarlo, lo que permite que el veneno se siga absorbiendo, aunado a una depuración rápida de los Fab's.

De manera habitual, los casos clínicos que presentan estas recurrencias, se tratan con administraciones en bolo IV cada que algún parámetro de coagulación presenta valores anormales, dando lugar a mejoras transitorias. Bush *et al.*, (2013) reportó cinco casos clínicos con recurrencia de envenenamiento, que fueron tratados con infusión IV continua de AV, lo que controló las hemorragias. Al parecer, este tipo de administración empata con la velocidad de absorción del veneno desde el sitio de inoculación, impidiendo que se distribuya en su forma activa y por lo tanto, ejerza su acción farmacológica

En la Figura 16b se muestra el porcentaje de dosis de veneno y AV encontrado en los principales órganos. Se encontró menos del 1% de la dosis en ambos casos, lo que muestra una neutralización importante si lo comparamos con el casi 20% que se alcanzó en riñones en los grupos envenenados, mostrado en la Figura 11a.

### **7.8 Farmacocinética de AV**

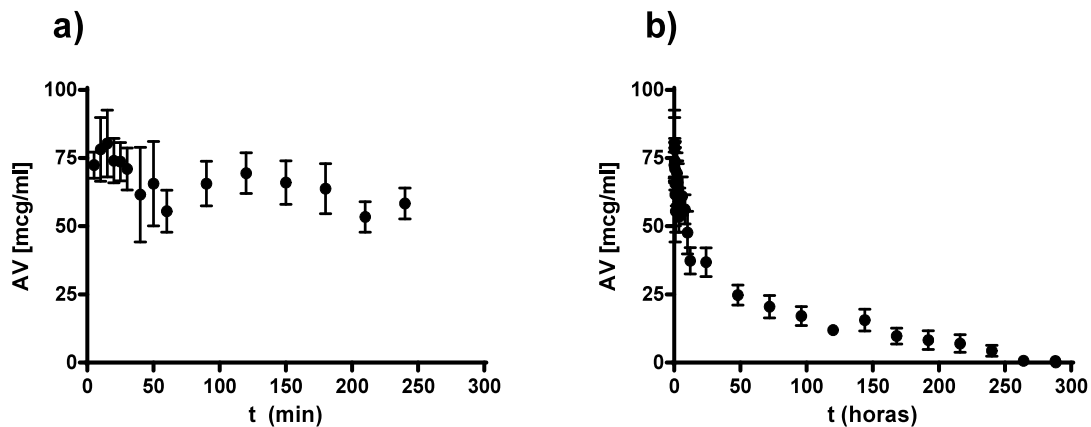
Con el fin de analizar si la cinética de AV se modificaba en presencia de veneno, se diseñó un grupo experimental, denominado AvIS (AV Intravenoso Sangre) en el que se administró solamente AV en bolo IV y se siguió su cinética por 11 días. En la Figura

8 se muestra la cinética de este grupo y en el Apéndice II se muestran las cinéticas individuales con el análisis FC correspondiente.

A partir de estas cinéticas, se hizo un análisis de regresión no lineal ajustando las cinéticas a un decaimiento tri-exponencial, descrito por la siguiente ecuación

$$Cp(t) = A * e^{(-k_1 t)} + B * e^{(-k_2 t)} + C * e^{(-k_3 t)}$$

Sin embargo, dos de las cinéticas tuvieron  $k_2$  y  $k_3$  muy cercanas, por lo que se decidió ajustar esas cinéticas a un comportamiento bi-exponencial. Estas diferencias entre individuos ya habían sido descritas por Vázquez *et al.* (2005) en cinéticas de  $F(ab')_2$  en humanos. La cinéticas mostraron un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.95 (\pm 0.03)$ , indicando un buen ajuste al modelo propuesto. En la Tabla 3 se resumen los parámetros FCs y se comparan con otros ya reportados. Con este fin, se reportan corregidos por peso.



**Figura 17.** FC del AV administrado vía IV.

Cinética del AV administrado vía IV. a) Se muestra la cinética durante las primeras seis horas. b) Se muestra la cinética durante 11 días. Los símbolos representan el valor promedio  $\pm$  SEM de  $n = 4$ .

Tabla 12. Comparativo de los parámetros FC de  $F(ab')_2$ 

	Borregos <sup>a</sup>	Conejos <sup>b</sup>	Conejos <sup>c</sup>	Borregos <sup>d</sup>	Humanos <sup>e</sup>	Conejos <sup>f</sup>
$V_c$ /peso (mL kg <sup>-1</sup> )	43.6 (30.5, 58.3)		90 (±9)	47.5 (20, 75)*	38.2 (28.9, 71.6)	56 (52, 59)
$V_{ss}$ /peso (mL kg <sup>-1</sup> )	79 (50.22, 121.3)	130 ± 5	216 (±9)	255 (145, 367)*	204 (183, 519)	554 (185, 1145)
MRT (h)	95 (93, 96)		46.7 (±1.4)		250 (219, 310)	211 (56, 575)
CL/peso (mL h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.83 (0.53, 1.31)	2.1 ± 0.01	5.4 (±5)		1.3 (0.846, 1.657)	3.88 (1.96, 7.24)
$t_{1/2,1}$ (h)			0.22 (±0.05)	0.24 (0.16, 0.41)	0.25 (0.13, 0.37)	0.16 (0.09, 0.23)
$t_{1/2,2}$ (h)	0.75 (0.45, 0.96)	2.9 ± 0.7	2.34 (±0.45)	0.96 (0.68, 1.65)	3.3 (2.2, 4.8)	2.48 (0.97, 4.43)
$t_{1/2,3}$ (h)	13.46 (7.8, 21.5)		33.84 (±0.93)		14.2 (10.7, 17.7)	
$t_{1/2,4}$ (h)	73.52 (66.9, 79.7)	55 ± 9			161.3 (141, 212)	113.2 (29.2, 197.1)

<sup>a</sup> Este trabajo, se reportan los promedios (min, max)

<sup>b</sup> Rivieré *et al.* (1997)

<sup>c</sup> Ismail *et al.* (1998) se reportan promedios (±SEM)

<sup>d</sup> Sevcik *et al.* (2004) \* parámetros calculados partir de los datos reportados por el autor: media (95% IC).

<sup>e</sup> Vázquez *et al.* (2005)

<sup>f</sup> Vázquez *et al.* (2010)

Los valores de  $t_{1/2}$  calculados para este trabajo están dentro de los intervalos reportados para distintas especies (Tabla 3), a excepción de la última  $t_{1/2}$ , que si bien concuerda con lo reportado por Rivieré *et al.* (1997) y con Ismail *et al.* (1998), está por debajo de lo reportado por Vázquez *et al.* (2005, 2010). Esta diferencia también se observa en MRT. La discrepancia entre los datos puede deberse al tiempo de muestreo, ya que Rivieré *et al.* (1997), Ismail *et al.*, (1998) y Sevcik *et al.* (2004) muestrearon por 5 horas, 4 días y 5 horas, respectivamente; mientras que los trabajos que reportan un MRT mayor, muestrearon durante 21 días en humanos adultos (Vázquez *et al.* 2005) y durante 11 días en conejos (Vázquez *et al.* 2010), y aunque en este trabajo se muestreó durante 11 días, la diferencia entre especies podría influir considerablemente en el MRT, mientras el CL no presenta diferencias significativas entre los reportes comparados. Estas diferencias ya se han reportado en estudios de escalamiento alométrico con distintas proteínas, en donde se ha visto que parámetros como el CL puede escalarse al peso corporal con cierta consistencia, mientras el  $V_D$  es directamente proporcional al peso corporal, pero no  $V_{ss}$ , en donde se sugiere que la diferencia entre ambos parece ser mayor en animales pequeños, mientras que la

biodisponibilidad de absorción SC se relaciona con el sitio de inoculación y parecieran ser específicos para cada especie [Woo y Jusko, 2007].

El  $V_D$  calculado es cercano al volumen plasmático y congruente con los valores reportados, mientras que el  $V_{ss}$ , es de alrededor del 8% del peso corporal, lo que indica una distribución pobre, que no alcanza todo el espacio intersticial, cuyo volumen se reporta en 17%. Este valor se encuentra por debajo de valores de  $V_{ss}$  reportados para  $F(ab')_2$ , lo que concuerda con la suposición de que el tiempo de muestreo no fue suficiente para observar las últimas fases de distribución y eliminación de los  $F(ab')_2$  en borregos adultos.

El reporte de Sevcik *et al.* (2005) es el primer reporte de un tiempo de vida media de menos de media hora para  $F(ab')_2$ , y es el único que muestra los datos a tiempos cortos. El autor muestra que la primera fase de decaimiento está dada por el primer y segundo punto, obtenidos a los 2 y 5 minutos de la inoculación y discute que los trabajos anteriores no reportan una vida media tan corta, debido a los intervalos de tiempo en los que se realizó el muestreo. Considerando que la primera muestra que tomamos fue a los 5 minutos, cabe la posibilidad que hayamos perdido la muestra de mayor concentración que da lugar al análisis de la primera fase de decaimiento, ya que los resultados en los que se evaluó la trasvasación de AV (grupo CSL-R), se observó que el AV trasvasa a linfa, apareciendo en ella a los 6 minutos de haber sido administrado vía IV.

En función de lo anterior, podemos decir, que aunque algunos de los parámetros FCs obtenidos en este trabajo podrían estar subestimados en la última fase cinética, el resto de los parámetros indica que el comportamiento observado es la cinética que siguen los  $F(ab')_2$  al administrarse vía IV.

Finalmente se comparó la relación entre  $C_{max}$  y  $C_z$  para analizar si la cinética se veía modificada por la formación de inmunocomplejos, pero no observamos diferencias en el comportamiento, teniendo que la concentración que se alcanza a las 4 horas (tiempo de cinética de los grupos CSL-R y CSS-R) representa el 65% de la  $C_{max}$  que es muy similar al 68% en CSS-R y 54% en CSL-R. Estos datos discrepan con lo reportado por Rivieré *et al.* (1998), ya que ellos observaron que la eliminación de los inmunocomplejos es más rápida que la eliminación de  $F(ab')_2$  libre. Sin embargo

nuestros datos no son concluyentes para decir que la cinética del AV se modifica al formar inmunoacomplejos (veneno/AV) ya que se sabe que máximo el 10-20% de los anticuerpos del AV son específicos contra el veneno, por lo cual el 80-90% restante no formará inmunocomplejos y el ELISA utilizado en este trabajo no discrimina entre  $F(ab')_2$  libre o inmunocomplejos.

## 8 CONCLUSIONES

A partir de la determinación de las FCs del veneno de *Micrurus fulvius* administrado vía SC, se demostró, por primera vez, que el sistema linfático tiene un papel determinante, en el proceso de absorción del veneno, que es retenido en el sitio de inoculación, por lo que se dice que este sitio funciona como un depósito a partir del cual el veneno se absorbe de manera paulatina.

La absorción vía linfática contribuye a mantener el estado estacionario de las concentraciones de veneno en suero, modificando su biodisponibilidad y aumentando su tiempo de residencia.

El AV administrado vía IV neutraliza instantáneamente el veneno que se encuentra en circulación sistémica, no así el que se absorbe por linfa, ya que la neutralización en este fluido es paulatina y parcial, lo que permite que cierta cantidad activa de veneno siga llegando a sangre. Esto se da como consecuencia de la disparidad farmacocinética, dada por la distribución limitada del AV en tejido poco irrigado como el tejido subcutáneo, lo que limita la neutralización del veneno retenido en este sitio, permitiendo que siga activo y que se siga absorbiendo.

Aún cuando el MRT del AV es mucho mayor al del veneno, algunos componentes pueden ser neutralizados sólo en las primeras etapas, como consecuencia de que no todos los anticuerpos que se mantienen en circulación tienen la capacidad de neutralizar todos los componentes del veneno. Esto se da debido a que gran parte de los anticuerpos se eliminan en la primera fase FC.

## 9 PERSPECTIVAS

- Ya que los borregos no podían permanecer anestesiados por más de 6 horas, debido a la timpanización que se produce por la posición en la cama de cirugía, no nos fue posible seguir la absorción completa, observando solo el estado estacionario, pero no la fase de eliminación. Por lo que es importante desarrollar un modelo experimental que permita obtener cinéticas a tiempos más largos.
- Debido al peso y la talla del modelo animal, su manejo es complicado y aunado, a las limitaciones propias de la cirugía, se recomienda establecer también un modelo en alguna especie de laboratorio más manejable (e.g., rata o conejo). El modelo permitiría calcular los coeficientes alométricos de veneno y AV en el animal pequeño para de ahí pasar a experimento de comprobación en el animal grande.
- Caracterizar la farmacodinamia de los  $F(ab')_2$ . Algunos reportes muestran que la vida media de IgGs está dada por la interacción con receptores a Fc, y que cuando están ausentes (ratones knockout FcRn), la vida media disminuye considerablemente [Hansen y Balthasar, 2002], mostrando vidas medias menores a las reportadas para  $F(ab')_2$ , pero no para Fab, por lo que podría suponerse que el tiempo de residencia de los  $F(ab')_2$  no está determinada solo por sus propiedades fisicoquímicas, sino por alguna interacción con algunos receptores.
- Desarrollar un ensayo que permita la detección y cuantificación únicamente de inmunocomplejos veneno-AV para determinar si su FC es distinta a la de las componentes no acomplexados, y así, tener una mejor caracterización del proceso de rescate con AV.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

1. Audebert, F., Urtizberea, M., Sabouraud, A., Scherrmann, JM., & Bon, C. (1994). Pharmacokinetics of Vipera aspis venom after experimental envenomation in rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(3), 1512-1517.
2. Aukland, K., & Reed, R. K. (1993). Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiological reviews*, 73(1), 1-78.
3. Barnes, J. M., & Trueta, J. (1941). Absorption of bacteria, toxins and snake venoms from the tissues: importance of the lymphatic circulation. *The Lancet*, 237(6142), 623-626.
4. Barrientos, S. A., Martinez, N. W., Yoo, S., Jara, J. S., Zamorano, S., Hetz, C., Twiss, J. L., Alvarez, J., Court, F. A. (2011). Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of Neuroscience*, 31(3), 966-978.
5. Bookbinder, L. H., Hofer, A., Haller, M. F., Zepeda, M. L., Keller, G. A., Lim, J. E., Edgindton T, Shepard H, Patton J. & Frost, G. I. (2006). A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 114(2), 230-241.
6. Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4), 423-428.
7. Bjarnason, J. B., & Fox, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology & Therapeutics*, 62(3), 325-372.
8. Boyer, L. V., Seifert, S. A., Clark, R. F., McNally, J. T., Williams, S. R., Nordt, S. P., Walter F. G., & Dart, R. C. (1999). Recurrent and persistent coagulopathy following pit viper envenomation. *Archives of Internal Medicine*, 159(7), 706-710.
9. Boyer, L. V., Chase, P. B., Degan, J. A., Figge, G., Buelna-Romero, A., Luchetti, C., & Alagón, A. (2013). Subacute coagulopathy in a randomized, comparative trial of Fab and F(ab')<sub>2</sub> antivenoms. *Toxicon*, 74, 101-108.
10. Bucarechi, F. (1990). Elapidic envenomation: clinical features. *Memórias do Instituto Butantan*, 52, 333-34.
11. Bush, S. P., Seifert, S. A., Oakes, J., Smith, S. D., Phan, T. H., Pearl, S. R., & Reibling, E. T. (2013). Continuous IV Crotalidae polyvalent immune Fab (ovine)(FabAV) for selected North American rattlesnake bite patients. *Toxicon*, 69, 29-37.,
12. Chain, E., & Duthie, E. S. (1940). Identity of hyaluronidase and spreading factor. *British Journal of Experimental Pathology*, 21(6), 324.
13. Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (1998). Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, 36(6), 823-846.
14. Chippaux, J. P. (2006). *Snake Venoms*. Krieger Publishing Company.
15. Dahlberg, A., Kaminskas, L. M., Smith, A., Nicolazzo, J. A., Porter, C. J., Bulitta, J. B., & McIntosh, M. P. (2013). The lymphatic system plays a major role in the intravenous and subcutaneous pharmacokinetics of trastuzumab in rats. *Molecular Pharmaceutics*. 11(2), 496-504.



16. Doley R, Zhou X and Kini R. M. Snake venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes. In: Mackessy SP, editor. Handbook of Venom And Toxins of Reptiles. CRC Press. Taylor and Francis Group; 2010.
17. Duran-Reynals, F. (1939). A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. *The Journal of Experimental Medicine*, 69(1), 69-81.
18. Fidler, H. K., Glasgow, R. D., & Carmichael, E. B. (1940). Pathological changes produced by the subcutaneous injection of rattlesnake (*Crotalus*) venom into *Macaca mulatta* monkeys. *The American Journal of Pathology*, 16(3), 355.
19. Girish, K. S., Shashidharamurthy, R., Nagaraju, S., Gowda, T. V., & Kemparaju, K. (2004). Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra *Naja naja* venom. *Biochimie*, 86(3), 193-202.
20. Girish, K. S., Jagadeesha, D. K., Rajeev, K. B., & Kemparaju, K. (2002). Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 240(1-2), 105-110.
21. Gold, B. S., Barish, R. A., & Dart, R. C. (2004). North American snake envenomation: diagnosis, treatment, and management. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 22(2), 423-443.
22. Gutierrez J. M., León G., Lomonte B. (2003). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clinical pharmacokinetics*, 42(8), 721-741.
23. Gutiérrez, J., Romero, M., Díaz, C., Borkow, G., & Ovadia, M. (1995). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, 33(1), 19-29.
24. Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997-1011.
25. Guyton A. C & Hall J. E. (2001). Tratado de Fisiología Médica. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. Décima ed. 197-211.
26. Hati, R., Mitra, P., Sarker, S., & Bhattacharyya, K. K. (1999). Snake venom hemorrhagins. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 29(1), 1-19.
27. Ismail, M., Abd-Elsalam, M. A., & Al-Ahaidib, M. S. (1998). Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins: flash absorption and distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')<sub>2</sub> and F(ab) of the antivenin. *Toxicon*, 36(1), 93-114.
28. Kagan, L. (2014). Pharmacokinetic modeling of the subcutaneous absorption of therapeutic proteins. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(11), 1890-1905.
29. Kamiguti, A. S., Zuzel, M., & Theakston, R. D. G. (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 7.
30. Kinnunen, H. M., & Mørn, R. J. (2014). Improving the outcomes of biopharmaceutical delivery via the subcutaneous route by understanding the chemical, physical and physiological properties of the subcutaneous injection site. *Journal of Controlled Release*, 182, 22-32.

31. Kitchens C. S. & Van Mierop L. H. S. (1987). Envenomation by the Eastern Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*). 258: 1615-1618
32. Kota, J., Machavaram, K. K., McLennan, D. N., Edwards, G. A., Porter, C. J., & Charman, S. A. (2007). Lymphatic absorption of subcutaneously administered proteins: influence of different injection sites on the absorption of darbepoetin alfa using a sheep model. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(12), 2211-2217.
33. Krifi, M. N., Savin, S., Debray, M., Bon, C., El Ayeb, M., & Choumet, V. (2005). Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon*, 45(2), 187-198.
34. McLennan, D. N., Porter, C. J., & Charman, S. A. (2005). Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 89-96.
35. Mora, J., Mora, R., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2008). Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10), e318.
36. Morais, J. F., De Freitas, M. C. W., Yamaguchi, I. K., Dos Santos, M. C., & Da Silva, W. D. (1994). Snake antivenoms from hyperimmunized horses: Comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F (ab')<sub>2</sub> fragments *Toxicon*, 32(6), 725-734.
37. Onizuka, M., FlatebØ, T., & Nicolaysen, G. (1997). Lymph flow pattern in the intact thoracic duct in sheep. *The Journal of physiology* 503.Pt 1 (1): 223-234.
38. Pepin, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., & Scherrmann, J. M. (1995). Snake F (ab')<sub>2</sub> antivenom from hyperimmunized horse: Pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administrations in rabbits. *Pharmaceutical Research*, 12(10), 1470-1473.
39. Porter C. J. H., Charman S. A. (2000). Lymphatic transport of proteins after subcutaneous administration. *Journal of Pharmaceutical Science*. 89:297-310.
40. Prasarnpun, S., Walsh, J., Awad, S. S., & Harris, J. B. (2005). Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain*, 128(12), 2987-2996.
41. Ramsey, G. F., & Klickstein, G. D. (1962). Coral snake bite: report of a case and suggested therapy. *The Journal of the American Medical Association*, 182(9), 949-951.
42. Reid, H. A., & Theakston, R. D. G. (1983). The management of snake bite. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 885.
43. Richter, W. F., & Jacobsen, B. (2014). Subcutaneous Absorption of Biotherapeutics: Knowns and Unknowns. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(11), 1881-1889.
44. Rigoni M, Paoli M, Milanesi E, Caccin P, Rasola A, Bernardi P, Montecucco C. (2008) Snake phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34013-34020.
45. Rivière, G., Choumet, V., Audebert, F., Sabouraud, A., Debray, M., Scherrmann, J. M., & Bon, C. (1997). Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(1), 1-8.

46. Rossetto O, Montecucco C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. In: Freiburg KS, editor. Handbook of experimental pharmacology, vol 184: Pharmacology of neurotransmitter release. Berlin: Springer-Verlag; 2008, p.129-170.
47. Rowland, M., & Tozer, T. N. (1995). *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications* (Vol. 3). Baltimore: Williams & Wilkins.
48. Roze JA. 1996. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification, and Venoms. Ed. Krieger Publishing Company.
49. Sánchez E. E., López-Johnston J. C., Rodríguez-Acosta A. Pérez J. C. (2008). Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. *Toxicon*. 51: 297-303.
50. Shargel, L., Andrew, B. C., & Wu-Pong, S. (2005). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics* (Vol. 270). New York:: McGraw-Hill.
51. Seifert S. A., Boyer L. V., Dart R, Porter R, Sjostrom L. (1997) Relationship of Venom Effects to Venom Antigen and Antivenom Serum Concentrations in a Patient With *Crotalus atrox* Envenomation Treated With a Fab Antivenom. *Annals of Emergency Medicine*; 30(1):49-53.
52. Seifert, S. A., & Boyer, L. V. (2001). Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. *Annals of Emergency Medicine*, 37(2), 189-195
53. Sevcik C, D'Suze G, Díaz P, Salazar V, Hidalgo C, Azpúrua H, Bracho N. (2004). Modelling *Tityus* scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's  $F(ab)_2$  extrusion mechanism from blood to tissues. *Toxicon*. 44: 731-741.
54. Sim, S. M., Saremi, K., Tan, N. H., & Fung, S. Y. (2013). Pharmacokinetics of *Cryptelytrops purpureomaculatus* (mangrove pit viper) venom following intravenous and intramuscular injections in rabbits. *International Immunopharmacology*, 17(4), 997-1001.
55. Supersaxo A., Hein W. R., Steffen H. (1990). Effect of molecular weight on the lymphatic absorption of water-soluble compounds following subcutaneous administration. *Pharmaceutical Research*, 7(2), 167-169.
56. Swartz M. A. (2001). The physiology of the lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(1), 3-20.
57. Tan, C. H., Sim, S. M., Gnanathanan, C. A., Fung, S. Y., & Tan, N. H. (2014). Pharmacokinetics of the Sri Lankan Hump-nosed Pit Viper (*Hypnale hypnale*) Venom following intravenous and intramuscular injections of the venom into rabbits. *Toxicon*, 79, 37-44.
58. Tang, L., & Meibohm, B. (2006). Pharmacokinetics of peptides and proteins. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs: Principles and Case Studies in Drug Development*. John Wiley & Sons.
59. Takakura, Y., Mahato, R. I., & Hashida, M. (1998). Extravasation of macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34(1), 93-108.
60. Teixeira, C. F. P., Landucci, E. C. T., Antunes, E., Chacur, M., & Cury, Y. (2003). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> *Toxicon*, 42(8), 947-962.

61. Theakston, R. D. G. (1997). An objective approach to antivenom therapy and assessment of first aid measures in snake bite. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91(7), 857-866.
62. Tu, A. T., & Hendon, R. R. (1983). Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 76(2), 377-383.
63. Upton, R. N. (2008). Organ weights and blood flows of sheep and pig for physiological pharmacokinetic modelling. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58(3), 198-205.
64. Vázquez, H., Chavez-Haro, A., Garcia-Ubbelohde, W., Mancilla-Nava, R., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Sevcik, C. (2005). Pharmacokinetics of a F (ab')<sub>2</sub> scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon*, 46(7), 797-805.
65. Vázquez, H., Chávez-Haro, A., García-Ubbelohde, W., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Sevcik, C. (2010). Pharmacokinetics of a F (ab')<sub>2</sub> scorpion antivenom administered intramuscularly in healthy human volunteers. *International Immunopharmacology*, 10(11), 1318-1324.
66. Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C. V., Possani L. D. & Alagón, A. (2014). Eastern coral snake *Micrurus fulvius fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Journal of Proteomics*, 105, 295-306.
67. Vugmeyster, Y., Xu, X., Theil, F. P., Khawli, L. A., & Leach, M. W. (2012). Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(4), 73.
68. Walter F. G., Bilden E. F., Gilby R. L. (1999). Envenomations. *Critical Care Clinics* 15:353-384
69. Wiig, H., & Swartz, M. A. (2012). Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiological Reviews*, 92(3), 1005-1060.
70. Wisniewski, M. S., Hill, R. E., Havey, J. M., Bogdan, G. M., & Dart, R. C. (2003). Australian Tiger Snake (*Notechis scutatus*) and Mexican Coral Snake (*Micrurus species*) Antivenoms Prevent Death from United States Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*) Venom in a Mouse Model. *Clinical Toxicology*, 41(1), 7-10.
71. WHO. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/).
72. Woo S. & Jusko W. (2007). Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin. *Drug Metabolism and Disposition*. 35, 1672-1678.
73. Wood, A., Schauben, J., Thundiyil, J., Kunisaki, T., Sollee, D., Lewis-Younger, C Bernstein J., & Weisman, R. (2013). Review of eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998-2010. *Clinical Toxicology*, 51(8), 783-788.
74. Wu, F., Bhansali, S. G., Law, W. C., Bergery, E. J., Prasad, P. N., & Morris, M. E. (2012). Fluorescence imaging of the lymph node uptake of proteins in mice after subcutaneous injection: molecular weight dependence. *Pharmaceutical Research*, 29(7), 1843-1853.

75. Yap, M. K. K., Tan, N. H., Sim, S. M., & Fung, S. Y. (2013). Toxicokinetics of *Naja sputatrix* (Javan spitting cobra) venom following intramuscular and intravenous administrations of the venom into rabbits. *Toxicon*, 68, 18-20
76. Yingprasertchai, S., Bunyasrisawat, S., & Ratanabanangkoon, K. (2003). Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium auro-thiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected with *Naja kaouthia* and *Calloselasma rhodostoma* venoms. *Toxicon*, 42(6), 635-646.



## APENDICE I.

Obtención y evaluación de los anticuerpos utilizados en el ensayo de ELISA para la cuantificación de veneno de *Micrurus fulvius*.

### Esquema de hiperinmunización

Para obtener los anticuerpos específicos que reconocieran el veneno de *Micrurus fulvius*, se inmunizaron 4 conejos de la cepa New Zeland. En la tabla AI.1 se presenta el esquema de hiperinmunización correspondiente.

<b>Tabla AI.1</b> Esquema de hiperinmunización para la obtención de anticuerpos anti veneno de <i>Micrurus fulvius</i> .		
<b>Día</b>	<b>veneno * (mcg /conejo)</b>	<b>Adyuvante</b>
1	30	Completo de Freund
10	30	Incompleto de Freund
20	30	Alumina
30	60	Incompleto de Freund
40	60	Alumina
50	100	Incompleto de Freund
61	100	Alumina
71	100	Incompleto de Freund
79	200	Alumina
97	200	Incompleto de Freund
110	200	Alumina
120	200	Incompleto de Freund
133	250	Alumina

\*Cada dosis se aforó a 1 mL con PBS y se emulsionó con 1 mL del adyuvante correspondiente

Al término del esquema de inmunización los conejos se sangraron a blanco, se obtuvo el suero y se preservó a -20 °C hasta su uso.

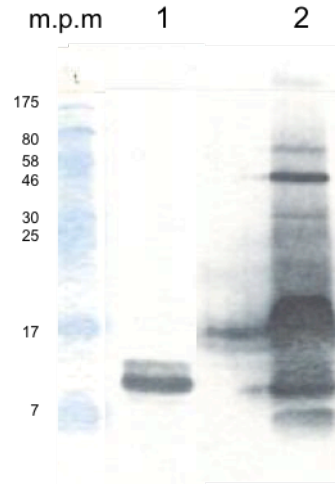
## ***Inmunopurificación de anticuerpos de conejo anti veneno de *Micrurus fulvius****

La inmunopurificación se realizó mediante cromatografía de afinidad. Para ello se acoplaron 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* a 0.5 g de sepharosa 4B CN-Br activada y se empacaron en una columna de 3 ml. La columna se estabilizó con 20 volúmenes de Tris-HCl 0.1M pH 8 + NaCl 150 mM. En esta columna se pasaron 40 ml del pool del suero de conejo hiperinmunizado. Los anticuerpos retenidos, se eluyeron con ácido acético 0.1M hasta obtener una  $A_{280nm}=0.01$ . y el pH se neutralizó con Tris-HCl 1M pH 8. Los anticuerpos obtenidos se dializaron exhaustivamente contra PBS utilizando una membrana de diálisis con corte de 12,000 Da y se concentraron hasta 1 mg/ml en un centricon marca Millipore utilizando una membrana con corte de 12,000 Da.

### ***Western Blot***

Con el fin de analizar que proteínas del veneno eran reconocidas por los anticuerpos inmunopurificados se realizó un western Blot. Para ello se hizo un gel de SDS-PAGE al 17% en el que se corrieron 2 mg de veneno de *Micrurus fulvius* en condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol) y sin reducir. La corrida se realizó a 90 V para el alineamiento de las proteínas en el gel separador y 120 V para el gel separador. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de Biorad® por una hora a corriente constante (400 mA) en una cámara semi-seca modelo HEP-1 de OWL. Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche descremada en polvo, resuspendida en TBST, se incubó con 1 mcg/mL de anticuerpos inmunopurificados y se reveló con anticuerpos de cabra anti conejo acoplado a AP en dilución 1:1000 y NBT/BCIP de Invitrogen®. En la Figura A1.1 se muestra la imagen del western blot, en donde se observa que los anticuerpos inmunopurificados reconocen a las distintas proteínas que conforman el veneno.





**Figura AI.1.** Western Blot de 2 mg de veneno de *Micrurus fulvius*, utilizando los anticuerpos inmunopurificados. En el carril 1 esta el veneno en condiciones reductoras y en el carril 2 el veneno sin reducir.

### **Biotinación de anticuerpos inmunopurificados**

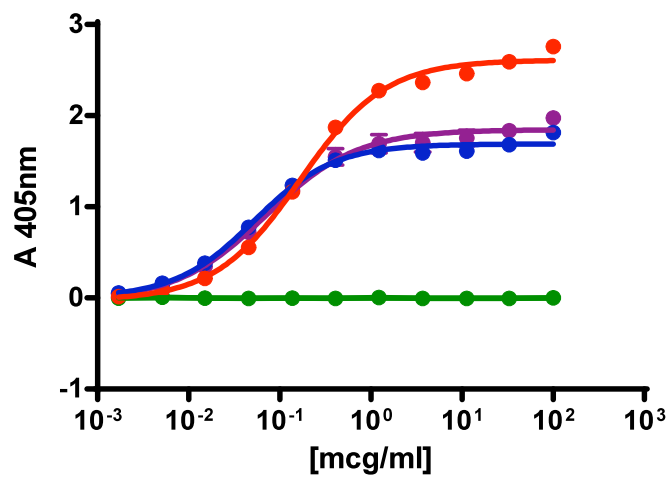
Con el fin de minimizar el ruido de fondo en el ELISA, se decidió biotinar parte de los anticuerpos inmunopurificados y así, utilizar los mismos anticuerpos para captura y detección. La biotinación se hizo con el siguiente protocolo: Se incubaron 3 mg de anticuerpos inmunopurificados con 160 mcg de NHS-Biotina de Pierce® disuelto en DMSO, en una solución 0.1M de NaHCO<sub>3</sub> a temperatura ambiente; después de 60 minutos se dializaron contra TBS pH 8.

La biotinación se evaluó en ensayos de ELISA indirectos (Figura AI.2), en donde se sensibilizó con 1 mcg/ml de veneno de *Micrurus fulvius*; en la tabla AI.2. se muestran los anticuerpos que se utilizaron para el control positivo, control negativo, evaluar la biotinación y la estabilidad de los anticuerpos después del proceso. Para revelar se utilizó ABTS de Research Organics y se cuantificó la absorbancia a una  $\lambda=405$  nm en un lector de microplacas Sunrise™ de Tecan.

<b>Tabla AI.2. Anticuerpos utilizados en el ELISA para la evaluación de biotinación</b>		
	<b>Anticuerpo de detección<sup>a</sup></b>	<b>Anticuerpo de revelado<sup>b</sup></b>
control positivo	IgG de conejo sin biotinar	IgG cabra anti conejo - HRP
control negativo	IgG de conejo sin biotinar	estreptavidina - HRP
estabilidad de anticuerpos	IgG de conejo biotinado	IgG cabra anti conejo - HRP
biotinación	IgG de conejo biotinado	estreptavidina - HRP

<sup>a</sup> Concentración inicial 100 mcg/mL y diluciones seriadas 1:2  
<sup>b</sup> Dilución 1:1000

En la Figura AI.2. se muestran las curvas de los ELISAS

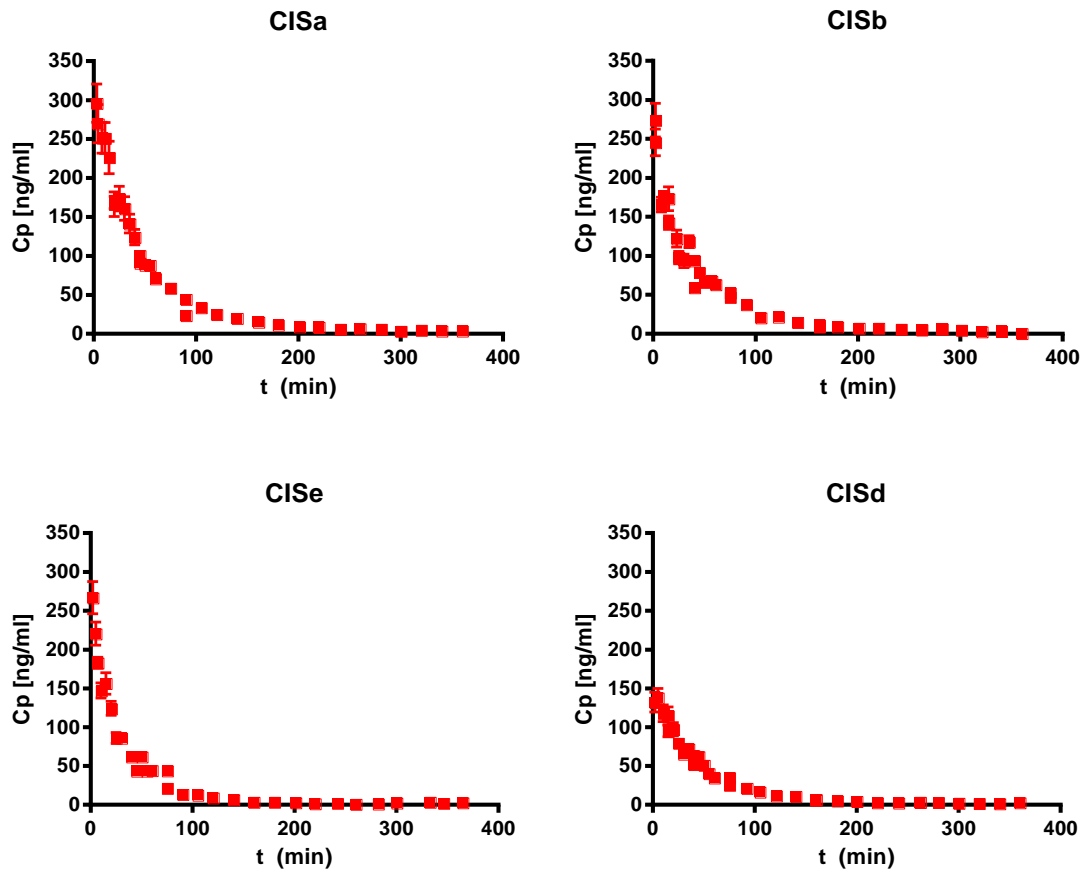


**Figura AI.2.** Curva del control positivo (●), curva de control negativo (●), curva de evaluación de estabilidad de anticuerpos (●), curva de evaluación de biotinación (●). Cada punto representa el promedio de n=2.

# Apendice II

Cinéticas de veneno y AV en sangre y linfa de cada individuo; con el análisis farmacocinético correspondiente.

## Coral Intravenoso Sangre CIS



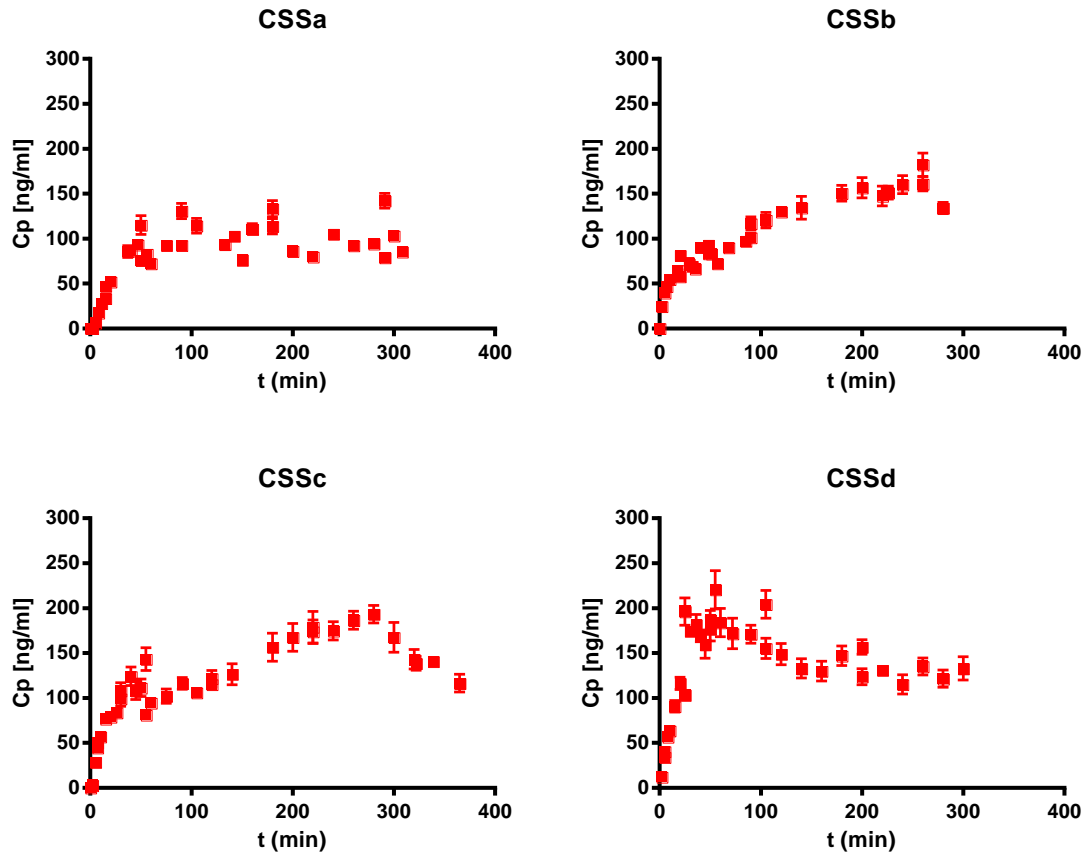
**Figura AII.1.** Cinética de veneno en suero de cada individuo del grupo CIS, después de administrar 1 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía I.V. en borregos CISa y CISb y 0.5 mg en borregos CISd y CISe

**Tabla AII.1.** Análisis farmacocinético no compartimental después de administrar 1 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía I.V.

	<b>CISa</b>	<b>CISb</b>	<b>CISd*</b>	<b>CISE*</b>	<b>prom</b>	<b>SEM</b>
sexo	hembra	hembra	hembra	hembra		
peso (kg)	42	50	60	40	48	4.5
Dosis (mg)	1	1	1	1		
C <sub>Smax</sub> (ng/ml)	296.30	259.80	264.70	533.60	339	65.5
C <sub>z</sub> (ng/ml)	3.9	0.7	1.74	0.9	1.81	0.7
λ <sub>z</sub> (min <sup>-1</sup> )	2.51 x 10 <sup>-2</sup>	2.73 x 10 <sup>-2</sup>	2.19 x 10 <sup>-2</sup>	4.19 x 10 <sup>-2</sup>	2.9 x 10 <sup>-2</sup>	4.4 x 10 <sup>-3</sup>
t <sub>1/2</sub> (min)	27.60	25.44	31.67	16.53	25.31	3.2
V <sub>c</sub> (l)	3.37	3.85	3.78	1.87	3.22	0.5
V <sub>c</sub> (%)	8%	8%	6%	5%	7%	0.8%
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml*min)	13,750	10,406	13,875	15,259	13,323	1,030.7
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml*min <sup>2</sup> )	829,747	603,947	835,182	676,878	736,439	57,415.4
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*min)	14,467	10,726	14,274	15,467	13,733	1,036.1
AUMC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*min <sup>2</sup> )	1,446,509	705,954	1,150,830	762,093	1,016,347	174,192.0
CL (ml/min)	69.1	93.2	70.1	64.7	74.27	6.4
MRT (min)	100.0	65.8	80.6	49.3	73.93	10.8
V <sub>ss</sub> (l)	6.9	6.1	5.6	3.2	5.47	0.8
V <sub>ss</sub> (%)	16%	12%	9%	8%	12%	0.0
En orina (ng)	3645.6	3229.3	584.7	350.8	1952.64	862.8
En orina (% de Dosis)	0.36%	0.32%	0.06%	0.04%	0.20%	0.001

\* Datos corregidos a una dosis de 1mg I.V.

## Coral Subcutáneo Sangre CSS

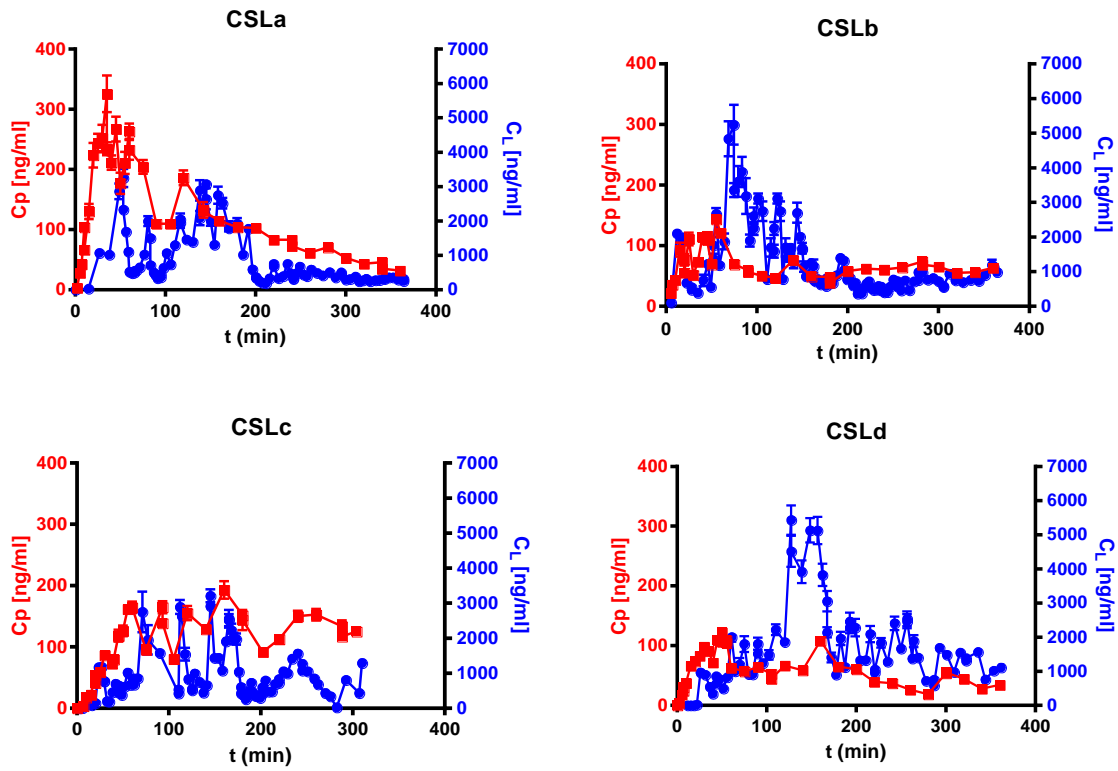


**Figura AII.2.** Cinética de veneno en suero de cada individuo del grupo CSS, después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* via S.C.

**Tabla AII.2.** Análisis farmacocinético no compartimental después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía S.C.

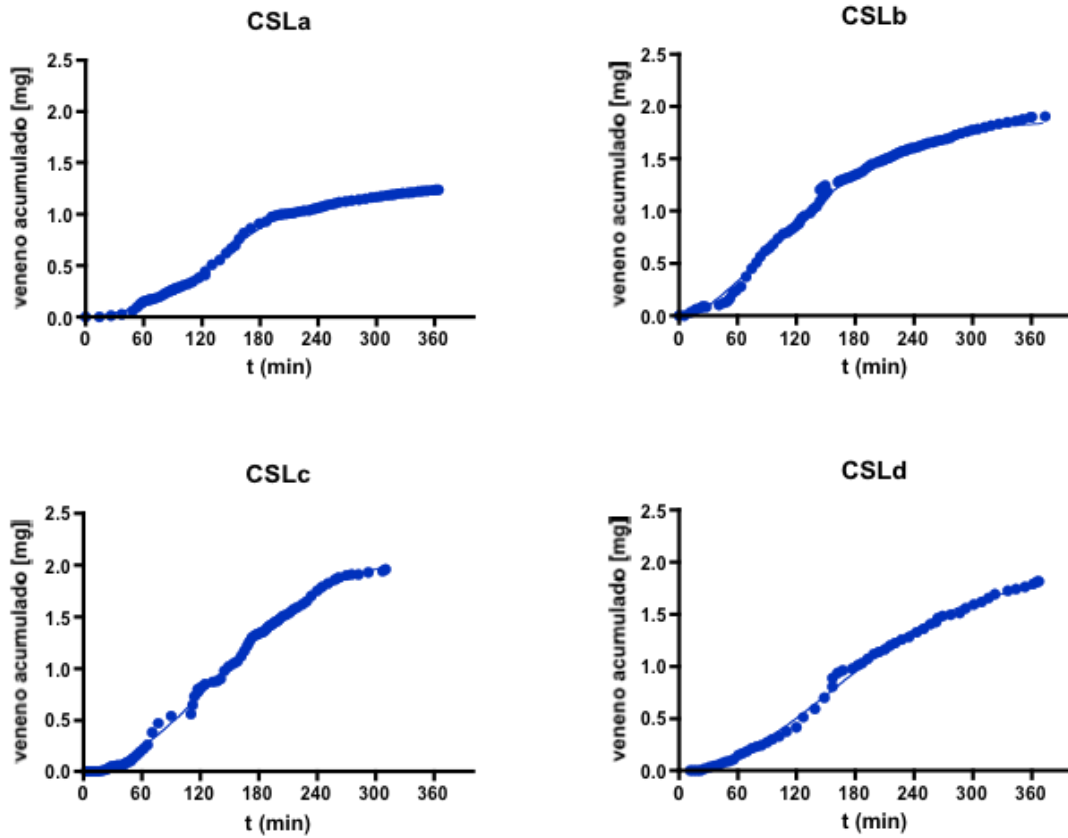
	<b>CSSa</b>	<b>CSSb</b>	<b>CSSc</b>	<b>CSSd</b>	<b>Promedio</b>	<b>SEM</b>
Sexo	macho	macho	hembra	hembra		
Peso (kg)	40	41	52	36	42	3.4
Dosis (mg)	5	5	5	5		
C <sub>max</sub> (ng/ml)	122.5	185.4	195	220.5	<b>181</b>	21
t <sub>max</sub> (min)	105	220	160	55	<b>162</b>	29
C <sub>z</sub> (ng/ml)	85.3	134.1	116.4	132.9	<b>117</b>	11
λ <sub>z</sub> (min <sup>-1</sup> )	-2.82 x 10 <sup>-3</sup>	-5.35 x 10 <sup>-3</sup>	-2.58 x 10 <sup>-3</sup>	-1.74 x 10 <sup>-3</sup>	<b>-3.12 x 10<sup>-3</sup></b>	7.79 x 10 <sup>-4</sup>
t <sub>½</sub> (min)	246	129	269	399	<b>261</b>	55
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min)	33,786	37,133	50,867	42,416	<b>41,050</b>	3,723
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	6,516,740	6,802,232	10,089,787	6,196,650	<b>7,401,352</b>	904,640
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml * min)	64,034	62,179	96,014	118,928	<b>85,289</b>	13,639
AUMC <sub>0-∞</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	27,490,560	20,090,098	45,128,794	71,942,346	<b>41,162,949</b>	11,525,690
CL (mL/min)	78.1	80.4	52.1	42.0	<b>63</b>	9
MRT (min)	429.3	323.1	470.0	604.9	<b>457</b>	58
V <sub>ss</sub> (L)	33.5	26.0	24.5	25.4	<b>27</b>	2
V <sub>ss</sub> (%)	84%	63%	47%	71%	<b>66%</b>	8%
MAT(min)	365.4	259.2	406.1	541.0	<b>393</b>	58
F (%)	50%	54%	75%	62%	<b>60%</b>	5%
En orina (ng)	8190	3444	26888	763	<b>9821</b>	5893
En orina (% de Dosis)	0.16%	0.07%	0.54%	0.02%	<b>0.20%</b>	0.12%

## Coral Subcutáneo Linfa CSL



**Figura AII.3.** Cinética de veneno en suero (■) y en linfa (■) de cada individuo del grupo CSL, después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* via S.C.



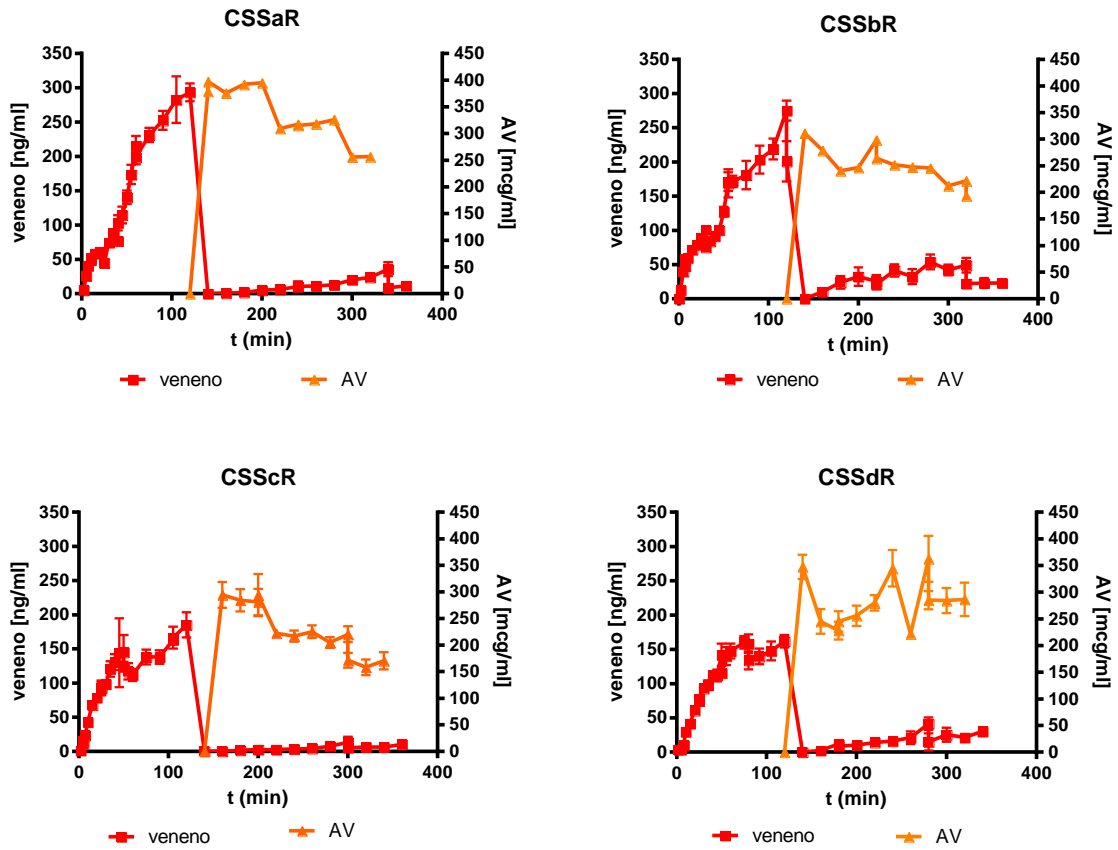


**Figura AII.4.** Concentraciones acumuladas de veneno en linfa en cada individuo del grupo CSL después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía S.C.

**Tabla A II.3.** Análisis farmacocinético no compartimental en suero y parámetros cinéticos en linfa después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía S.C.

	CSLa	CSLb	CSLc	CSLd	Promedio	SEM
Sexo	hembra	hembra	macho	macho		
Peso (kg)	45	45	55	55	50.0	3
Dosis (mg)	5	5	5	5		
<b>SUERO</b>						
C <sub>max</sub> (ng/ml)	279.9	143.6	193	114.3	182.7	36
t <sub>max</sub> (min)	35	55	140	50	46.7	5.2
C <sub>Z</sub> (ng/ml)	31.9	63.6	118.5	34.6	62.2	20.1
λ <sub>z</sub> (min <sup>-1</sup> )	-4.05 x 10 <sup>-3</sup>	-1.90 x 10 <sup>-3</sup>	-1.46 x 10 <sup>-3</sup>	-3.22 x 10 <sup>-3</sup>	-2.66 x 10 <sup>-3</sup>	5.94 x 10 <sup>-4</sup>
t <sub>½</sub> (min)	171	364	474	215	306	69
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min)	40,559	23,062	37,307	19,882	30,202	5,125
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	5,416,920	3,975,498	6,073,078	3,072,364	4,634,465	680,456
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml * min)	48,443	56,483	118,360	30,637	63,481	19,073
AUMC <sub>0-∞</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	9,231,693	28,222,837	89,558,474	8,729,162	33,935,541	19,087,927
CL (mL/min)	103.2	88.5	42.2	163.2	99.3	25.0
MRT (min)	190.6	499.7	756.7	284.9	433.0	126
V <sub>ss</sub> (L)	19.7	44.2	32.0	46.5	35.6	6
V <sub>ss</sub> (%)	44%	98%	58%	85%	71%	12%
MAT(min)	126.7	435.8	692.8	221.0	369.1	126
F (%)	61%	35%	56%	30%	45%	8%
<b>LINFA</b>						
C <sub>max</sub> (ng/ml)	4326.2	6407.1	8143.7	7081.4	6489.60	804.85
t <sub>max</sub> (min)	145	68.5	71	148.5	108.25	22.25
C <sub>Z</sub> (ng/ml)	268	1077.3	2455.4	917.1	1179.45	459.90
veneno en linfa (mg)	0.9	1.9	0.9	1.4	1.28	0.22
F (%)	19%	38%	19%	27%	26%	0.04
linfa drenada (L)	1.125	1.131	1.086	0.888	1.06	0.06
Flujo linfático (mL/min)	3.1	3.0	3.5	2.4	3.01	0.22
En orina (ng)	496	522	171	29,262	7,613	7,217
En orina (% de Dosis)	0.010%	0.010%	0.003%	0.59%	0.15%	0.1%

## Coral Subcutáneo Sangre - Rescate



**Figura AII.5.** Cinética de veneno (■) y AV (■) en suero de cada individuo del grupo CSS-R, después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* via S.C. y el AV via I.V. dos horas después.

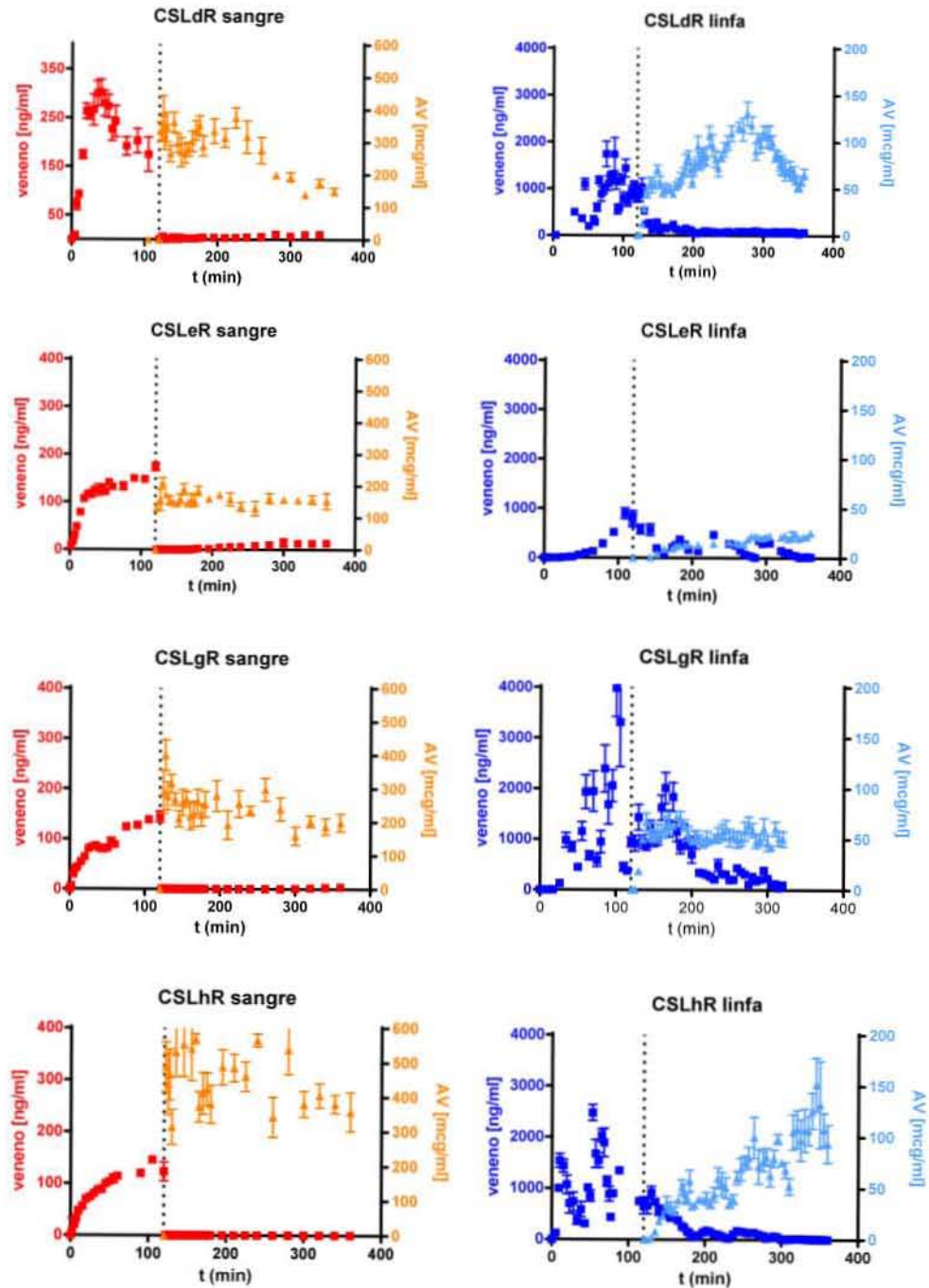
**Tabla AII.4.** Análisis farmacocinético de 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* administrado vía S.C.

	<b>CSSaR</b>	<b>CSSbR</b>	<b>CSScR</b>	<b>CSSdR</b>	<b>Promedio</b>	<b>SEM</b>
Sexo	macho	macho	macho	macho		
Peso (kg)	45	56	55	55		
C <sub>max</sub> (ng/ml)	293.0	238	185.1	161.7	219.5	29.25
t <sub>max</sub> (min)	120	120	120	120	120.0	0.00
C <sub>z</sub> (ng/ml)	11.5	22.8	10.0	30.4	18.68	4.84
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min)	25,732.70	26,507.50	17,134.20	18,721.00	22,023.85	2,392.28
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	2,679,977.10	3,348,593.60	1,534,695.70	2,080,674.50	2,410,985.23	390,347.56
CL (mL/min)	194.3	188.6	291.8	267.1	235.5	25.92
MRT (min)	104.1	126.3	89.6	111.1	107.8	7.64
V <sub>ss</sub> (L)	20.2	23.8	26.1	29.7	25.0	1.99
V <sub>ss</sub> (%)	45%	43%	48%	54%	47%	0.02
MAT(min)	29.1	51.3	14.6	36.1	32.8	7.64
F (%)	39%	40%	26%	28%	33%	4%
AUC <sub>0-120</sub> (ng/ml * min)	23,312.70	19,925.50	16,161.20	15,247.30	18,661.68	1,603.50
AUMC <sub>0-120</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	1,974,523.70	1,613,973.60	1,253,522.40	1,194,941.10	1,509,240.20	156,451.54
F <sub>0-120</sub> (%)	35%	30%	24%	23%	28%	2%
AUC <sub>120-360</sub> (ng/ml * min)	2,420.00	6,582.00	973.00	3,298.00	3,318.25	1,029.55
AUMC <sub>120-360</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	705,453.30	1,734,620.00	281,173.30	885,733.30	901,744.98	264,288.76
F <sub>120-360</sub> (%)	4%	10%	1%	5%	5%	2%

**Tabla AII.5.** Análisis farmacocinético no compartimental de AV en sangre, administrado vía I.V. después de dos horas de envenenamiento S.C.

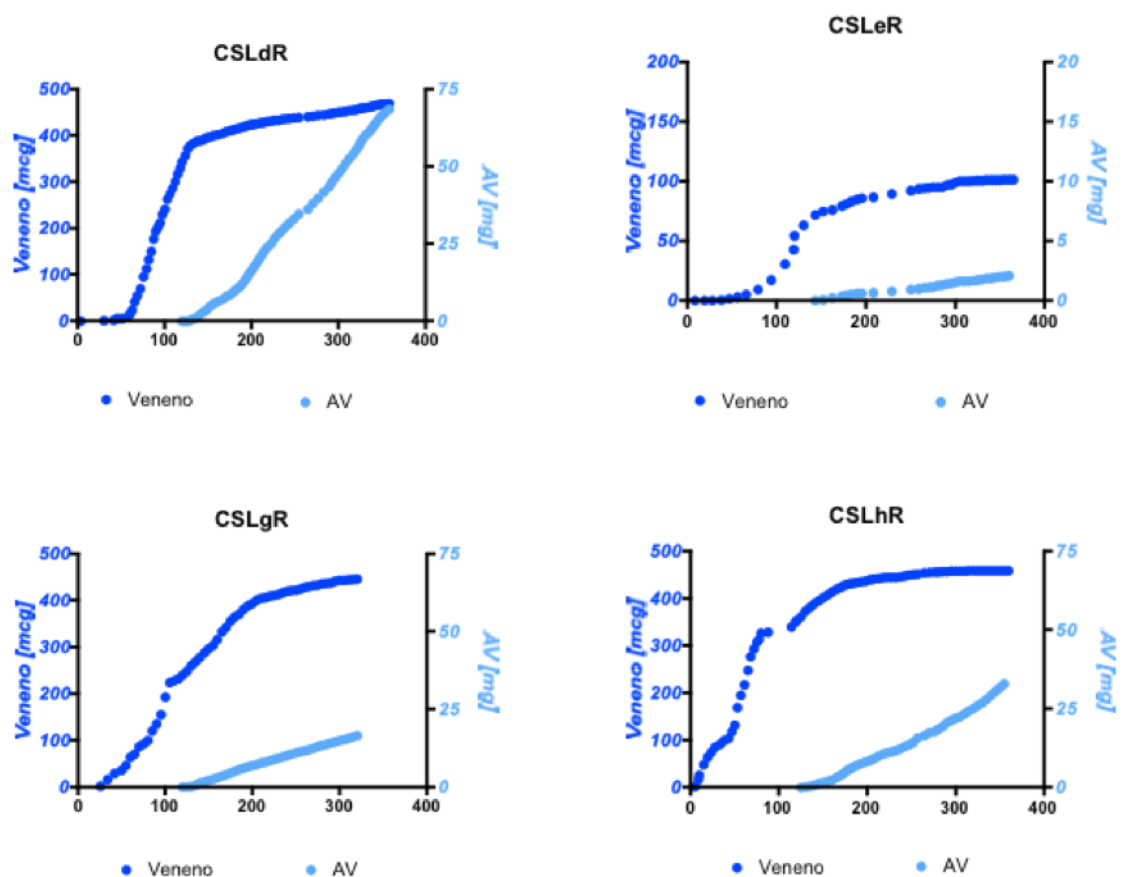
	<b>CSSaR</b>	<b>CSSbR</b>	<b>CSScR</b>	<b>CSSdR</b>	<b>prom</b>	<b>DS</b>
sexo	macho	macho	macho	macho		
peso (kg)	45	56	55	55	52.8	5.2
Dosis (mg)	1620	1620	1620	1620		
C <sub>smax</sub> (ng/ml)	379	312	294	348	333	19
C <sub>z</sub> (ng/ml)	257	194	171	287	227	27
λ <sub>z</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.003	0.003	0.002	0.0008	0.002	0.001
t <sub>1/2</sub> (min)	225	224	279	889	404	162
V <sub>c</sub> (l)	4.3	5.2	5.5	4.7	4.9	0.2
V <sub>c</sub> (%)	9%	9%	10%	8%	9%	0.3%
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml*min)	78,199	58,329	53,174	64,875	63644	5,410
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml*min <sup>2</sup> )	9,153,149	6,921,037	5,978,716	8,225,473	7569594	700,556
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*min)	161,487	120,800	121,860	432,350	209,124	75,008
AUMC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*min <sup>2</sup> )	56,165,611	42,071,849	50,132,932	567,590,855	178,990,312	129,565,678
CL (ml/min)	20.7	27.8	30.5	25.0	26	2.1
MRT (min)	117.0	118.7	112.4	126.8	119	3.0
V <sub>ss</sub> (l)	2.4	3.3	3.4	3.2	3.1	0.2
V <sub>ss</sub> (%)	5.4%	5.9%	6.2%	5.8%	5.8%	0.0

## Coral Subcutáneo Linfa "Rescate" CSL-R



**Figura AII.6.** Cinética de veneno (■) y AV (□) en suero y de veneno (■) y AV (□) en linfa, de cada individuo del grupo CSS-L, después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* via S.C. y el AV correspondiente via I.V. dos horas después del envenenamiento.

## Acumulados en linfa



**Figura AII.7.** Cantidades acumuladas de veneno (■) y AV (□) absorbido por linfa después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía S.C. y el AV correspondiente dos horas después del envenenamiento.

**Tabla AII.6.** Análisis farmacocinético no compartimental en sangre de 5 mg de veneno administrado vía S.C.

	<b>CSLdR</b>	<b>CSLeR</b>	<b>CSLgR</b>	<b>CSLhR</b>	<b>Promedio</b>	<b>SEM</b>
Sexo						
Peso (kg)	46	62	60	72	60.0	3.21
C <sub>max</sub> (ng/ml)	301.8	173.8	144.5	146.2	191.6	8.22
C <sub>z</sub> (ng/ml)	10.8	13.6	4.0	0	7.1	3.49
t <sub>max</sub> (min)	40	120	120	105	96.3	4.33
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min)	24,549	16,458	12,034	12,141.80	16,296	1261.86
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	1,669,895	1,503,056	915,024	864,659.00	1,238,159	177467.12
CL (mL/min)	203.7	303.8	415.5	411.8	334	31.72
MRT (min)	68.0	91.3	76.0	71.2	77	5.25
V <sub>ss</sub> (L)	13.9	27.7	31.6	29.3	26	0.97
V <sub>ss</sub> (%)	30%	45%	53%	41%	42%	3%
F (%)	37%	25%	18%	18%	24%	2%
AUC <sub>0-120</sub> (ng/ml * min)	23,298	14,852	11,862	12,142	15,539	2,673
AUMC <sub>0-120</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	1,344,244	1,034,190	860,131	864,659	1,025,806	113,611
F <sub>0-120</sub> (%)	35%	22%	18%	18%	23%	4%
AUC <sub>120-360</sub> (ng/ml * min)	1,252	1,606	165	0	756	397
AUMC <sub>120-360</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	325,652	468,866	54,893	0	212,353	111,252
F <sub>120-360</sub> (%)	2%	2%	0.2%	0%	1%	1%



**Tabla AII.7.** Análisis farmacocinético no compartimental de AV administrado vía I.V. administrado dos horas después del envenenamiento S.C.

	<b>CSLdR</b>	<b>CSLeR</b>	<b>CSLgR</b>	<b>CSLhR</b>	<b>prom</b>	<b>SEM</b>
sexo						
peso (kg)	46	62	60	72	60.0	5.4
D (mg)	336.00	336	686	686	511.0	101.0
tz (min)	240.00	240	240	240	240.0	0.0
Vd	0.87	1.61	1.72	1.08	1.3	0.2
Vd	2%	3%	3%	2%	0.0	0.31%
Cz (mcg/ml)	148.00	152.5	198.7	357.5	214.2	49.1
Cp <sub>max</sub> (mcg/ml)	386.80	209	400	634	407.5	87.2
t <sub>max</sub> (min)	125.00	130	127	140	130.5	3.3
AUC <sub>0-t</sub> (mcg/ml * min)	62,484	37,351	55,254	107,726	65,703.7	14,970.3
AUMC <sub>0-t</sub> (mcg/ml * min <sup>2</sup> )	6,530,931	4,444,930	6,303,375	12,356,192	7,408,857.0	1,714,006.8
CL (ml/min)	5.38	9.00	12.42	6.37	8.3	1.6
MRT (min)	104.52	119.01	114.08	114.70	113.1	3.1
Vss (l)	0.56	1.07	1.42	0.73	0.9	0.2
Vss (%)	1%	2%	2%	1%	2%	0%

**Tabla AII.8.** Parámetros cinéticos de veneno y AV en linfa, después de administrar 5 mg de veneno de *Micrurus fulvius* vía S.C. y AV administrado via I.V. dos horas después del envenenamiento.

		<b>CSLdR</b>	<b>CSLeR</b>	<b>CSLgR</b>	<b>CSLhR</b>	<b>prom</b>	<b>SEM</b>
	linfa drenada (L)	1.28	0.34	0.59	0.90	0.78	20%
	flujo linfa (ml/min)	3.58	0.94	1.83	2.50	2.21	0.56
VENENO	Dosis (mg)	5	5	5	5		
	Cp <sub>max</sub> (ng/ml)	1743.0	902.4	3983.7	2477	2276.5	653.68
	t max (min)	75.7	109	100	53	84.4	12.62
	Cz (ng/ml)	73.6	21.9	104.0	2.1	50.4	23.37
	veneno total (mg)	0.5	0.1	0.4	0.4	0.36	0.09
	F (%)	9%	2%	9%	9%	7%	2%
		Dosis (mg)	336	336	686	686	
AV	Cp <sub>max</sub> (mcg/ml)	130.68	25.4	72.1	152.1	95.1	28.7
	t max (min)	156.75	240	60	225	170.4	41.0
	Cz (mcg/ml)	60.7	25.4	50.4	93.7	57.5	14.1
	veneno total (mg)	68.5	2.1	16.4	32.9	30.0	14.3
	F (%)	20%	0.62%	2.4%	4.8%	7%	5%

# Antiveneno Intravenoso Sangre (AvIS)

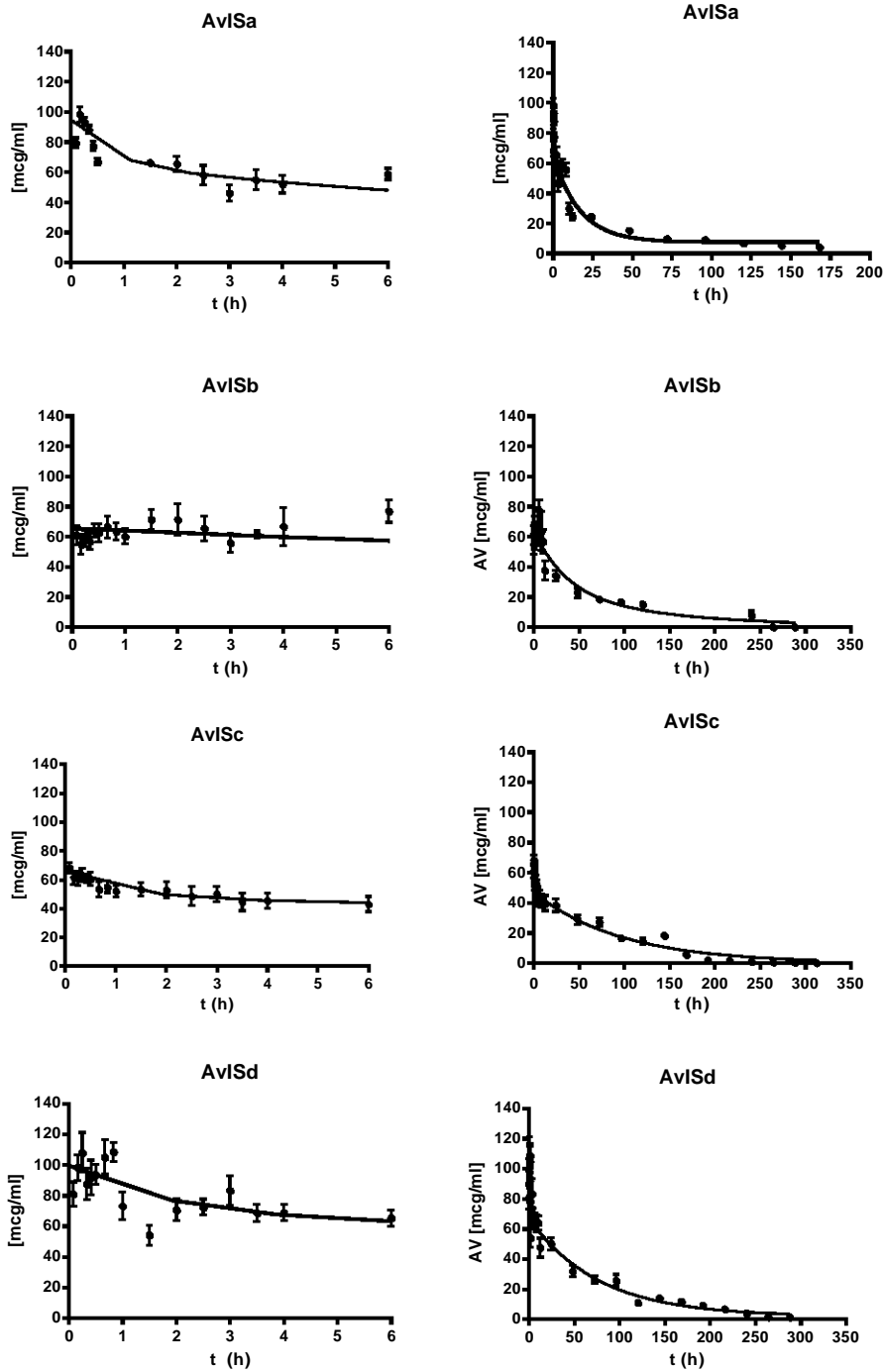


Figura AII.8. Cinética de AV en sangre administrado vía I.V.

**Tabla AII.9.** Análisis farmacocinético no compartimental de Av administrado vía I.V.

	<b>AvISa</b>	<b>AvISb</b>	<b>AvISc</b>	<b>AvISd</b>	<b>prom</b>	<b>SEM</b>
sexo	hembra	hembra	macho	macho		0
peso (kg)	45	45	55	55	50	2.89
D (mg)	168	168	168	168	168	0.00
t 1/2	69.3	115.5	46.2	69.3	75.1	14.54
tz (h)	168	288	288	288	258	30.03
Cz (mcg/ml)	4.5	0.0	0.2	1.5	2	1.04
$\lambda_z$	0.01	0.006	0.015	0.01	0.010	0.002
Cp <sub>max</sub> (mcg/ml)	98.3	88.9	68.3	108.6	91	8.58
t max (h)	0.17	2	0.08	0.83	0.77	0.44
AUC <sub>0-t</sub> (mcg/ml * h)	2,335.70	5,194.50	4,266.10	5,465.70	4,315.50	708.15
AUMC <sub>0-t</sub> (mcg/ml * h <sup>2</sup> )	121,103.50	493,864.50	300,759.30	424,904.80	335,158.03	81,774.51
CL (ml/h)	60.31	32.34	39.28	29.92	40	6.91
MRT (h)	86.8	95.1	71.3	86.0	85	4.95
Vss (l)	5.2	3.1	2.8	2.6	3	0.61
Vss (%)	12%	7%	5%	5%	7%	2%
AUC <sub>t-∞</sub> (mcg/ml * h)	450.0	0.0	11.3	150.0	153	105
AUC <sub>0-∞</sub> (mcg/ml * h)	2,786	5,195	4,277	5,616	4,468	627
AUMC <sub>t-∞</sub> (mcg/ml * h <sup>2</sup> )	120,600	0	4,024	58,200	45,706	28,272
AUMC <sub>0-∞</sub> (mcg/ml * h <sup>2</sup> )	241,704	493,865	304,783	483,105	380,864	63,493
MRT <sub>0-∞</sub> (h)	86.8	95.1	71.3	86.0	85	5

## LYMPHATIC ROUTE OF TRANSPORT AND PHARMACOKINETICS OF *MICRURUS FULVIUS* (CORAL SNAKE) VENOM IN SHEEP

D. Paniagua, L. Jiménez, C. Romero, I. Vergara, A. Calderón, M. Benard, M.J. Bernas, H. Rilo, A. de Roodt, G. D'Suze, M.H. Witte, L. Boyer, A. Alagón

Instituto de Biotecnología (DP,LJ,IVAC,MB,AA), Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México; Departamento de Producción Agrícola y Animal (CR), Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, DF; Department of Surgery (MJB,HR,MHW), University of Arizona, Tucson, AZ, USA; Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (GDS), Caracas, Venezuela; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (AdeR); Venom Immunochemistry, Pharmacology, and Emergency Response (VIPER) Institute (LB), University of Arizona, Tucson, AZ, USA

### ABSTRACT

*The contribution of the lymphatic system to the absorption and systemic bioavailability of Micrurus fulvius venom after subcutaneous (SC) administration was assessed using a central lymph-cannulated sheep model. Micrurus fulvius venom was administered either by intravenous bolus (IV) or subcutaneous injection (SC) in 12 sheep with and without thoracic duct cannulation and drainage. Venom concentration in serum and lymph was determined by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in samples collected over a 6-hour period and in tissues harvested at the end of the experiment. Pharmacokinetic parameters were determined by a non-compartmental analysis. In the lymphatic cannulated group, over the 6 hours after the venom was administered, 69% of administered dose was accounted for in blood (45%) and lymph (25%). Negligible levels of venom were detected in organs and urine implying that the steady state observed after SC administration is maintained by a slow absorption process. Comparison of kinetics of the thoracic duct cannulated and non-cannulated groups showed that lymphatic*

*absorption contributed in an important way to maintenance of this steady state. These results show that the limiting process in the pharmacokinetics of Micrurus fulvius venom following SC administration is absorption, and that the lymphatic system plays a key role in this process.*

**Keywords:** *Micrurus fulvius*, coral snake, venom, lymphatic absorption, pharmacokinetics, thoracic duct, sheep

*Micrurus fulvius* is a coral snake endemic to the Southeastern United States. Bites are rare, but they cause local tissue reaction or pain at the bite site followed by a progressive paralysis that can evolve to respiratory arrest and death (1). Symptoms may be delayed for 18 hours after the bite (2) making diagnosis of severe envenomation challenging.

The venom is a complex mixture of low and high molecular weight proteins with different physicochemical properties and biological activities. Biologically active components include hyaluronidase (3), nucleotidase, phosphodiesterase and aminopeptidase (4). The primary toxins responsible for envenomation symptoms

include two groups of neurotoxins (5-10). The first group,  $\alpha$ -neurotoxins, are small proteins approximately 7 kDa in size which block the nicotinic acetylcholine receptor (11,12). The second,  $\beta$ -neurotoxins, are phospholipases A2 of approximately 13 kDa and these inhibit presynaptic acetylcholine release (13,14).

Coral snakes have short fixed fangs that require a chewing action to inject the venom (2). This feature suggests that injection of venom is by the SC route. Absorption kinetics of subcutaneously injected proteins have been studied extensively since 1963 (15), and more recently (16-20). Depending largely on size following SC administration, the bioavailability of these proteins varies from 20% to 100%, with a relatively slow rate of absorption evidenced by a prolonged terminal half-life in comparison to that observed after IV administration. Maximum plasma concentrations occur from 2 to 20 hrs after SC dosing (21). These observations are directly related to the way that proteins are absorbed from the injection site to the systemic circulation. When proteins are deposited in the interstitial space, they diffuse until reaching a vessel with permeable endothelium where they can be absorbed. The permeability of the blood vascular endothelium is restricted by size of intercellular junctions which allow exchange of gas and small molecules. Transport in the blood capillaries is limited by size and as solute size increases, permeability decreases (22). In contrast, the initial capillaries of the lymphatic system can have large gaps between adjacent endothelial cells allowing the entrance of larger molecules and even cells (23). Supersaxo and colleagues reported a linear relationship between molecular weight and lymphatic absorption for molecules of 0.2 to 19.0 kD (24).

While some earlier work has been reported on venom absorption kinetics in animals (25, 26), and large animals including sheep lymphatics have been cannulated in a wide variety of studies (17- 21,24, 27-29), the convergence of these approaches to describe absorption of venom via the lymphatics route

has not been explored, although the venom absorption via lymphatic system has been suggested since 1939 (30). Since lymph has a slow flow and small volume, absorption by this route should affect residence time in the body as well as absorption rate. Because much is unknown about the reservoir depots and transport of venom in the clinical setting and these parameters are largely responsible for the clinical course, a large animal model is needed to explore these parameters. Our model of envenomation in sheep offers the ability to study these depot and transport parameters as well as to define more closely the pharmacokinetics. Therefore, the aim of this study was to establish the pharmacokinetics of coral snake venom when injected IV and SC, and to assess the contribution of the lymphatic system to the absorption and systemic bioavailability of the *Micrurus fulvius* venom after SC administration.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals and Reagents*

*Micrurus fulvius* venom was obtained from the Natural Toxins Research Center (NTRC, TAMUK, Kingsville, Texas). Antibodies for the immunoassay were produced and purified from hyperimmunized rabbits in our laboratory and biotinized using EZ-link NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific Inc. II. USA). Streptavidin-Peroxidase (from *Streptomyces avidinii*) was purchased from Sigma-Aldrich, México and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) was from Research Organics Inc. (Cleveland, Ohio). Fine granular quartz was from Merk (Germany).

### *Study Design*

The study was conducted in Suffolk-Pelibuey hybrid sheep obtained from a Cuernavaca farm, and all experimental procedures were reviewed and approved by the IBT-UNAM Bioethical Committee.

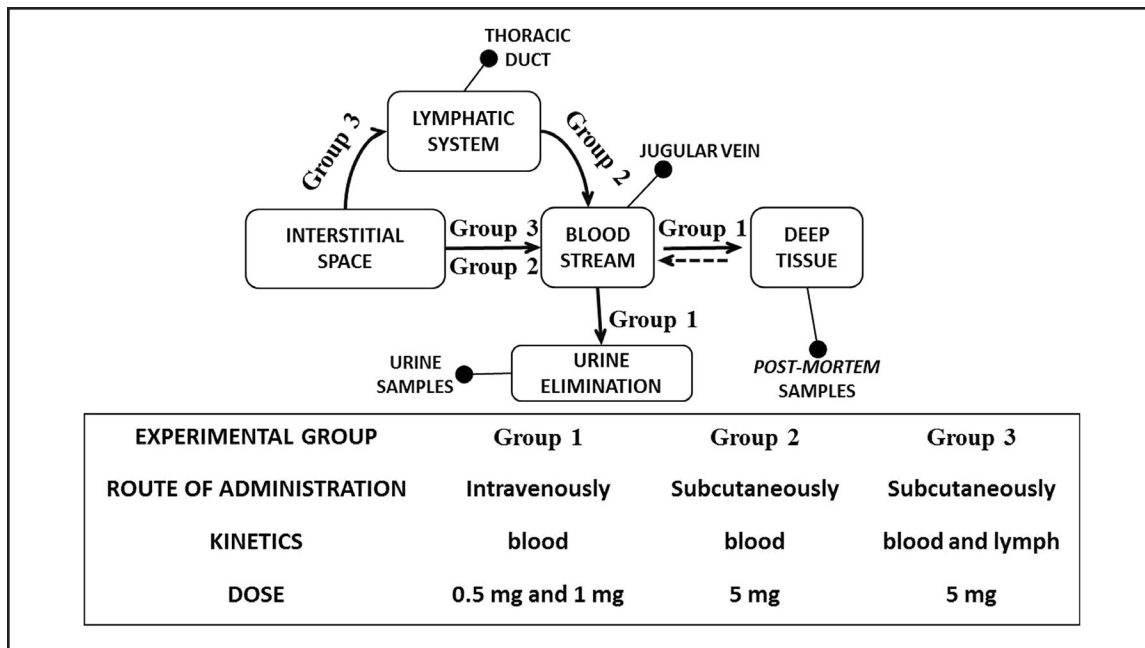


Fig. 1. Experimental design to analyze the absorption, distribution and elimination of the venom administered by subcutaneous route.

Animals were assigned to three treatment groups consisting of four sheep (Fig. 1). Group 1 received venom as an intravenous bolus and had blood sampled at intervals over 6 hours. Group 2 received venom SC and had blood sampled at the same intervals over 6 hours. Group 3 received venom SC and had blood sampled over 6 hours and in addition had lymph continuously collected from the thoracic duct for the 6 hours.

*Surgical Techniques*

Male and female adult sheep, weighing 36-60 kg were anesthetized. Anesthesia was induced with xylazine, butorphanol, and tiletamine/zolazepam and maintained with propofol and isoflurane in 100% O<sub>2</sub>. Heart rate, blood pressure and respiration were monitored and hydration in all 3 groups was maintained with a continuous IV infusion of isotonic saline. In addition, Group 3 animals received replacement volume of saline equal to that of thoracic duct lymph removed.

The jugular vein was cannulated for blood samples, and rumenotomy was performed to avoid pasture bloat. In Group 3, Evans blue dye was injected SC in the left hindlimb to assist visualization and cannulation of the thoracic duct. Cannulation was achieved by an incision into the left neck with the head recumbent to identify the thoracic duct at termination into the venous system. The duct was ligated just before entry into the vein to distend the vessel and a 22 gauge angiocath (Becton, Dickinson and Company, México) was inserted and secured with suture for collection. After 6 hours, all animals were sacrificed with an overdose of pentobarbital.

*Micrurus fulvius Venom Administration*

Solutions of *Micrurus fulvius* venom were prepared by reconstitution of lyophilized material with sterile saline to provide a final concentration of 0.5, 1.0 or 5.0 mg/ml. Intravenous injections were administered as a bolus into the saphenous vein of the right

hindlimb. In Group 1, two sheep received 1.0 mg of venom IV, and two received 0.5 mg of venom IV, in 1 ml. For Groups 2 and 3, we administered 5.0 mg SC to the left hindlimb of each sheep. The injected hindlimb was gently flexed and stretched for 30 seconds every 15 minutes throughout the 6 hours to promote lymph flow.

#### *Serum, Lymph, Urine and Organ Sampling*

After venom administration (time=0), blood samples were taken at 2, 5, 7, and 10 min, then at 5 min intervals for the next 50 min, then at 15 min intervals during the second hour, and finally every 20 min for the next four hours. Serum was separated, frozen, and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed.

All thoracic duct lymph was drained externally during the 6 hours and continuously collected into 15 ml tubes to measure flow for rate determination. Lymph fluid samples were centrifuged and the clear supernatant frozen, then maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed.

All urine was collected via indwelling bladder catheter. The collecting tube was changed at 15 minute intervals and the flow recorded to calculate rate. Urine samples were centrifuged, frozen, and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed.

Skin samples, including subdermis, were excised from around the injection site and the corresponding contralateral site post-mortem. Skin samples were homogenized with mortar and quartz crystal technique, then extracted in 5 ml of immunoassay vehicle solution (100 mM NaCl, 0.1% gelatin, 0.05% Tween 20, in 50 mM Tris/HCl buffer at pH 8) per gram of tissue for immunoassay.

Lungs, liver, kidneys, heart and spleen were removed post-mortem, mixed in a mechanical blender and a representative sample was homogenized using an Potter-Elvehjem tissue grinder. One gram of tissue was extracted in 5 ml of immunoassay vehicle solution.

#### *Determination of Micrurus fulvius Venom Concentration by Sandwich Immunoassay*

Venom concentrations in lymph, serum, urine, and tissues were determined using a sandwich immunoassay as previously described (31). Briefly, 96 well plates Maxiscorp (NUNC Inc., USA) were coated with polyclonal immunopurified antibodies from hyperimmunized rabbit serum against *Micrurus fulvius* venom. A 0.5% gelatin solution was applied as blocking solution. For detection, we used biotinated rabbit antibodies, revealed with Streptavidin-Peroxidase and ABTS. For quantification, a standard curve was established using 1:2 serial dilutions, starting with a venom concentration of 300 ng/ml. The standard curve had a lower limit of quantification of  $1.3 \pm 0.4$  ng/ml.

#### *Pharmacokinetic Analysis*

Pharmacokinetic parameters for *Micrurus fulvius* venom in serum after IV administration were generated by fitting the serum concentration ( $C_s$ ) versus time data, to a mono-exponential decay. The maximum concentration in serum ( $C_{s_{\max}}$ ) was estimated by extrapolation when  $t=0$  (32).

The pharmacokinetic parameters after SC were estimated using a non-compartmental model. The  $AUC_{0-t}$  and  $AUMC_{0-t}$  for all the experimental groups were estimated using the trapezoidal rule. Extrapolation to infinity was estimated using the last  $C_s$  measured at the time  $t$  and the terminal rate constant ( $\lambda_z$ ) (33).

The times taken to reach the maximum concentration ( $t_{\max}$ ), the serum concentrations at the end of the experiment ( $C_z$ ), and  $C_{s_{\max}}$  were taken directly from analytical data.

Statistical comparisons for all parameters between treatment groups were conducted using a one-way ANOVA test and Tukey's post test in Graph Pad prism 4.0.

The fraction of the venom dose recovered in lymph was calculated as the product of the



**TABLE 1p**  
**Pharmacokinetic Parameters<sup>a</sup> After IV And SC Administration Of *Micrurus Fulvius* Venom**

	Group 1	Group 2	Group 3	Statistical significance
Administration route	I.V.	S.C.	S.C.	
Dose (mg)	1	5	5	
C <sub>Smax</sub> (ng/ml)	339 (±65)	181 (±21)	183 (±36)	G.1. ≈ G.2. ≈ G.3.
C <sub>z</sub> (ng/ml)	1.8 (±0.1)	117 (±11)	62 (±20)	G.1. ≠ G.2. ≠ G.3.
t <sub>max</sub> (min)	-	162 (±29)	43 (±9)	G.2. ≠ G.3.
t <sub>1/2</sub> (min)	25.3 (±3.2)	261 (±55)	306 (±69)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
V <sub>D</sub> (l)	3.2 (±0.5)	-	-	
V <sub>D</sub> (%)	7 (±0.8)	-	-	
AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min)	13,323 (±1031)	41,050 (±3,723)	30,202 (±5,125)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
AUMC <sub>0-t</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	736,439 (±57,415)	7,401,352 (±904,639)	4,634,465 (±680,456)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml * min)	13,743 (±1009)	85,290 (±13,640)	63,481 (±19,074)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
AUMC <sub>0-∞</sub> (ng/ml * min <sup>2</sup> )	1,013,791 (±69,532)	41,161,824 (±11,526,922)	33,935,541 (±19,087,927)	G.1. ≠ G.2.; G.1. ≈ G.3.; G.2. ≈ G.3.
CL (ml/min)	74.1 (±6)	67 (±9)	99 (±25)	G.1. ≈ G.2. ≈ G.3.
MRT (min)	75 (±7)	457 (±58)	433 (±126)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
V <sub>ss</sub> (l)	5.7 (±0.9)	27 (±2)	36 (±6)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
V <sub>ss</sub> (%)	12 (±1.8)	66 (±8)	71 (±12)	G.1. ≠ G.2., G.3.; G.2. ≈ G.3.
MAT (min)	-	393 (±58)	369 (±126)	G.2. ≈ G.3.
F (%) <sup>c</sup>	-	60 (±5)	45 (±8)	G.2. ≈ G.3.
Recovered in lymph (% of dose)	-	-	25 (±3)	
Lymph flow (ml/min)	-	-	3 (±0.2)	
Total recovered (% of dose) <sup>b</sup>	-	60 (±5)	69 (±5)	G.2. ≈ G.3.
Recovered in urine (% of dose)	0.18 (±0.04)	0.22 (±0.12)	0.12 (±0.1)	G.1. ≈ G.2. ≈ G.3.

<sup>a</sup>The values shown represent the mean ± SEM

<sup>b</sup>Total recovered calculated for each animal, sum of the systemic availability, the cumulative percent recovered in lymph and in urine

<sup>c</sup>The bioavailability was calculated using the mean of AUC<sub>iv</sub>

(≈) No significant difference between treatments (α > 0.05)

(≠) Significant difference between treatments (α < 0.05)

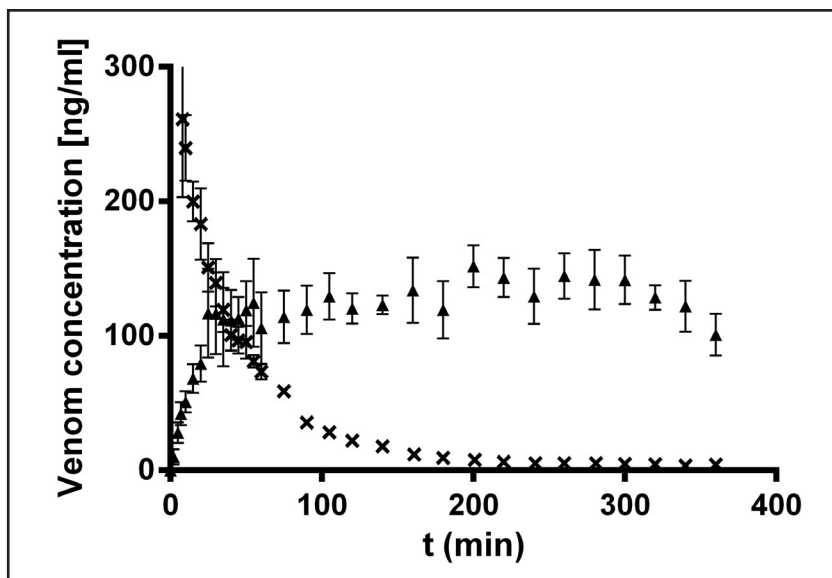


Fig. 2. Serum venom concentrations (Group 1) after the values of concentration have been corrected to 1 mg IV injection (x), and SC administration to non-cannulated sheep (Group 2) after SC injection of 5 mg of *M. fulvius* venom (▲). Symbols represent the mean  $\pm$  SEM for  $n = 4$  per treatment group.

concentration in the sample and the sample volume and was expressed as a percentage of administered dose. The cumulative percentage transported via the lymph was obtained by adding together the values of each interval. The total recovery of venom in group 3 was calculated by the sum of the amount of venom calculated in blood circulation and the cumulative fraction of dose recovered in lymph.

## RESULTS

Table 1 details the pharmacokinetic parameters calculated for venom in each group. Fig. 2 illustrates the serum venom levels, over time, in Groups 1 (IV venom injection) and 2 (SC venom injection). Fig. 3 shows the mean serum concentrations over time following SC administration in lymph-cannulated (Group 3) and non-cannulated (Group 2) sheep. Fig. 4 shows the cumulative percentage of venom dose collected in central lymph in Group 3, as a function of time. Fig. 4 also illustrates a lag

phase ( $21.9 \pm 3.4$  min), consistent with a delay during lymphatic flow from collecting vessels to the thoracic duct. The fraction of the injected venom that was recovered in lymph was  $25 \pm 3\%$ , representing  $36 \pm 7\%$  of the total accounted for in blood, lymph and urine. The highest concentration of venom found in lymph was  $3,943 \pm 604$  ng/ml at  $108 \pm 25$  min after venom injection. The average venom concentration in lymph during the six-hour experiment, without taking into consideration the lag phase, was  $1,157 \pm 327$  ng/ml.

Analysis of the injection site in groups 2 and 3 confirmed the presence of  $22 (\pm 12)$   $\mu\text{g}$  of venom per mg of skin. Skin from the contralateral side contained negligible ( $0.34 \pm 0.15$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Venom in heart, lungs, spleen, and kidneys was similarly low (data not shown). The liver had the highest organ level with a total venom content of  $87 \pm 24$   $\mu\text{g}$ . Since all the organ and skin values were found to be in  $\mu\text{g}$  quantities, the recovered venom levels were not used in calculating the total absorbed amount.

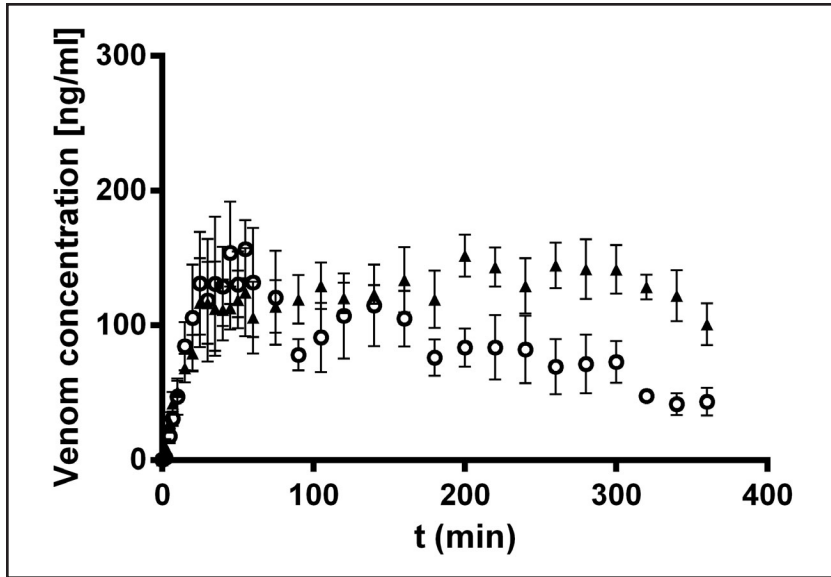


Fig. 3. Serum venom concentration following SC administration in non-cannulated [Group 2 ( $\blacktriangle$ )] and lymph-cannulated sheep (Group 3 ( $\circ$ )) after SC injection of 5.0 mg of *M. fulvius* venom. Symbols represent the mean  $\pm$  SEM for  $n = 4$  animals per treatment group.

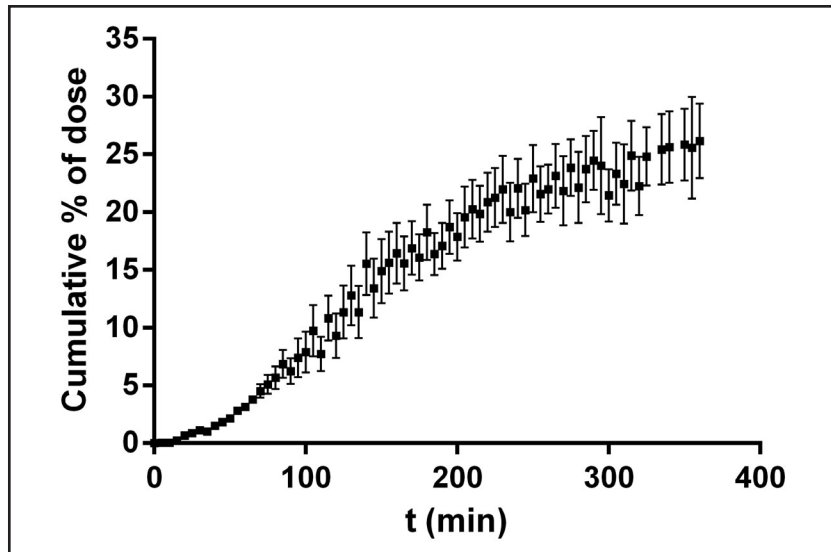


Fig. 4. Cumulative percentage of the venom dose collected in lymph-cannulated sheep (Group 3) after SC injection of 5 mg of *M. fulvius* venom. Symbols represent the mean  $\pm$  SEM for  $n = 4$  animals per treatment group.

#### DISCUSSION

Past models of venom pharmacokinetics have relied primarily on measurement of blood venom levels, occasionally supplemented

by urine and/or selected organ venom levels. The missing parameter which we now have available is the analysis of how the venom enters, transverse, and is retained in the lymphatic system. This multi-compartment

combination approach with measurement of venom in lymph enhances our understanding of the dynamic process of how venom passes from the site of injection into the systemic circulation. The kinetic analysis of lymphatic venom absorption also enables, for the first time, an explanation of sustained venom levels in blood following envenomation.

Group 1 enabled the calculation of conventional pharmacokinetic parameters following intravenous administration. The volume of distribution ( $VD = 3.2 \pm 0.5$  l) was very close to reported estimates of blood volume in sheep (34); and the VSS ( $6 \pm 0.9$  l) remained close to VD, implying minimal distribution from blood circulation to deep tissues (Shargel et al 2005). The short half life time ( $t_{1/2}$ ) of  $25 (\pm 3.2)$  minutes, mean residence time (MRT) of  $75 \pm 7$  minutes, and low levels detected in urine suggest that coral snake venom undergoes rapid systemic metabolism or renal degradation.

With SC administration in Group 2, conventional calculations demonstrate a more prolonged kinetic profile than following IV bolus, as expected. Rapid absorption during the first hour was followed by a steady state of venom in blood, lasting at least 5 hours following injection (Fig. 2). The Vss ( $27 \pm 21$ ) was greater after SC than after IV administration ( $6 \pm 0.9$  l) and this finding suggests that some subcutaneously injected venom remains at the site of injection for at least several hours. This observation is in accordance with mean absorption time (MAT) of  $393 \pm 58$  min. Together, these findings suggest that absorption from SC tissue is the limiting step for venom bioavailability, and they support the notion that the bite site serves as an ongoing venom depot (35).

The addition of a thoracic duct lymph-cannulated experimental group (Group 3) served two major purposes: first, to discover how much venom was absorbed via the lymphatic system; and second, to learn about the relative contribution of lymphatic absorption to blood venom levels. In Group 3, all lymph reaching the thoracic duct was

diverted before entering the blood circulation. During the first 60 minutes after venom injection, serum levels in cannulated and non-cannulated sheep were nearly identical (Fig. 3), suggesting that components of venom reaching the blood stream during this time did so primarily via direct absorption into blood (or possibly with some transfer to the blood stream at the lymph-blood interface in the first draining lymph nodes). Peak serum venom levels ( $C_{s_{max}}$ ) were comparable in the two groups (Table 1), but the levels diverged after the first 60 minutes, demonstrating that the impact of venom delivered by lymph to blood may include maintenance of steady state levels during the first 5 hours. Bioavailability (F, Table 1) was  $45 \pm 8\%$  in Group 3 and  $60 \pm 5\%$  in Group 2, but with the small sample size this did not reach statistical significance. Total venom recovered in blood and lymph following SC administration remained incomplete at the end of the 6-hour observation period, at 60% and 69% for Groups 2 and 3 respectively. The total amount of venom measured from all organs and urine was approximately 3% of administered dose. Because the total tissue was not recoverable from the injection site, an estimate of total remaining venom could not be obtained. The majority of the remaining venom is likely retained at or near the injection site (recovered levels at  $22 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) with much smaller levels possibly remaining in the lymphatic vessels and nodes as well as a very low level in the systemic circulation prior to metabolism and elimination.

The highest concentration of venom found in lymph was more than 25 fold the highest venom concentration reached in blood. This can be explained considering the differences between lymph and blood flow rates. Since blood flow is  $5,950 \pm 343$  ml/min (34), the venom levels are almost immediately diluted in the whole bloodstream; in contrast lymph flow rate was  $3 \pm 0.2$  ml/min. Consequently, we can estimate an average contribution by lymph, during the course of the experiment, of  $1.2 \pm 0.23$  ng of venom/ml

of blood/min, operating as a continuous mechanism venom supply into blood.

The immunoassay used in this study detects many different venom components, including low  $\alpha$ -neurotoxins (around 7 kDa), neurotoxic phospholipases (13 kDa), and high molecular weight (above 13 kDa) proteins. We acknowledge that pharmacokinetics of individual venom components must vary; however, this distinction could not be demonstrated in our study. The analysis of both lymph and blood in this model suggests that the lymph pool provides a sustained inoculum of venom and associated high molecular weight products destined for entry into the bloodstream while also percolating through regional lymph nodes involved in the continuing local immune response. This highlights the unexplored importance of the lymphatic system in examining different “envenomation syndromes”.

We have demonstrated that lymphatic absorption at the envenomation site plays a major role in the availability and kinetics of subcutaneously injected coral snake venom and its multiple components. Use of this combined blood and lymphatic sampling in a large animal model with the developed 3-part experimental design should provide insights into the absorption and distribution of other venoms, as well as the interaction of venoms and antivenoms and thereby shed further light on the varying clinical course of a wide variety of envenomation and also provide guidance in designing therapeutic strategies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CONACyT (México) for financial support (project C382-08) and fellowship to Dayanira Paniagua. We also thank Felipe Olvera and Alejandro Olvera for expert technical assistance and Ricardo Mondragon for animal handling and Angélica Linares for logistics. The help of Hilda Vázquez, Roberto P. Stock and Alejandro Carbajal in the initial experiments is much appreciated.

#### REFERENCES

1. Kitchens, CS, LHS Van Mierop: Envenomation by the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*). JAMA 258 (1987), 1615-1618.
2. Peterson, ME: Snake bite: Coral snakes. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 21(2006), 183-186.
3. Norris, RL, RR Pfalzgraf, G Laing: Death following coral snake bite in the United States - First documented case (with ELISA confirmation of envenomation) in over 40 years. Toxicol. 53 (2009), 693-697.
4. Aird, SD, NJ Da Silva: Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. Comp. Biochem. Physiol. 99B (1991), 287-294.
5. Vital Brazil, O: Pharmacology of coral snake venoms. Mem. Inst. Buntan. 52 (1990), 31-34.
6. Rosso, JP, O Vargas-Rosso, JM Gutiérrez, et al: Characterization of -neurotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> activities from *Micrurus* venoms. Eur. J. Biochem. 238 (1996), 231-239.
7. Serafim, FG, M Reali, MA Druz-Hofling, et al: Action of *Micrurus dumerillii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. Toxicol. 40 (2002), 167-174.
8. Dal Belo, CA, GB Leite, MH Toyama, et al: Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Micrurus dumerillii carinicauda* venom. Toxicol. 46 (2005), 736-750.
9. Olamendi-Portugal, T, CVF Batista, R Restano-Cassulini, et al: Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. Proteomics 8 (2008), 1919-1932.
10. Dokmetjian, JC, S del Canto, S Vinzón, et al: Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. Toxicol. 53 (2009), 375-382.
11. Nirthanan, S, MCE Gwee: Three-finger - neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. J. Pharmacol. Sci. 94 (2004), 1-17.
12. Norris, RL, RR Pfalzgraf, G Laing: Death following coral snake bite in the United States - First documented case (with ELISA confirmation of envenomation) in over 40 years. Toxicol. 53 (2009), 693-697.
13. Pungercar, J, I Krizaj: Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. Toxicol. 50 (2007), 871-892.
14. Montecucco, C, JM Gutierrez, B Lomonte: Cellular pathology induced by snake venom

- phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008), 2897-2912.
15. Långgård, H: The subcutaneous absorption of albumin in edematous states. *Acta Medica Scandinavica.* 174 (1963), 645-650.
  16. Radwanski, E, A Chakraborty, SV Wart, et al: Pharmacokinetics and leukocyte responses of recombinant human interleukin-10. *Pharm Res.* 15 (1998), 1895-1901
  17. Charman, SA, AM Segrave, GA Edwards, et al: Systematic availability and lymphatic transport of human growth hormone administered by subcutaneous injection. *J. Pharm. Science* 89 (2000), 168-177.
  18. Charman, SA, DN McLennan, GA Edwards, et al: Lymphatic absorption is a significant contributor to the subcutaneous bioavailability of insulin in a sheep model. *Pharm. Res.* 18 (2001), 1620-1626.
  19. McLennan, DN, CJH Porter, GA Edwards, et al: Pharmacokinetic model to describe the lymphatic absorption of r-methu-leptin after subcutaneous injection to sheep. *Pharm. Res.* 20 (2003), 1156-1162
  20. Kota, J, KK Machavaram, DN McLennan, et al: Lymphatic absorption of subcutaneously administered proteins: Influence of different injection sites on the absorption of dabepoetin alfa using a sheep model. *DMD* 35 (2007), 2211-2217.
  21. Porter, CJH, SA Charman: Lymphatic transport of proteins after subcutaneous administration. *J. Pharm. Science* 89 (2000), 297-310.
  22. Guyton, AC, JE Hall: *Tratado de fisiología médica.* McGraw-Hill 2001, 197-211.
  23. Swartz, MA: The physiology of the lymphatic system. *Adv. Drug Delivery Reviews* 50 (2001), 3-20.
  24. Supersaxo, A, WR Hein, H Steffen: Effect of molecular weight on the lymphatic absorption of water-soluble compounds following subcutaneous administration. *Pharm. Res.* 7 (1990), 167-169.
  25. Ismail M, MA Abd-Elsalam, MS Al-Ahaidib: Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins: Flash absorption and distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, f(ab')<sub>2</sub> and f(ab) of the antivenin. *Toxicon* 36 (1998), 93-114.
  26. Rivière, G, V Choumet, B Saliou, et al: Absorption and elimination of viper venom after antivenom administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285 (1998), 490-495.
  27. Lascelles, AK, B Morris: Surgical techniques for the collection of lymph from unanaesthetized sheep. *Exp. Physiol.* 46 (1961), 199-205.
  28. Porter, CJH. GA Edwards, SA Charman: Lymphatic transport of proteins after S.C. injection: Implications of animal model selection. *Adv. Drugs Del. Reviews* 50 (2001), 157-171.
  29. Yen, HH, JLK Wee, Snibson KJ. et al: Thoracic duct cannulation without thoracotomy in sheep: A method for accessing efferent lymph from the lung. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129 (2009), 76-81.
  30. Fidler, HK, RD Glasgow, Carmichael EB: Pathological changes produced by the subcutaneous injection of rattlesnake (*crotalus*) venom into *Macaca mulatta* monkeys. *Am. J. Pathol.* 16 (1939), 355-264.
  31. Boyer, LV, AA Theodorou, RA Berg, et al: Supplement to antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *N. Engl. J. Med.* 360 (2009), 2090-2098.
  32. Shargel, L, S Wu-Pong, ABC Yu: *Biopharmaceutics & Pharmacokinetics.* McGraw-Hill, 2005, 51-59
  33. AGAH working group pharmacokinetics: Collection of terms, symbols, equations, and explanations of common pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters and some statistical functions. (2004), 3-5.
  34. Upton, RN: Organ weights and blood flows of sheep and pig for physiological pharmacokinetic modelling. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 58 (2008), 198-205.
  35. Theakston, RDG: An objective approach to antivenom therapy and assessment of first-aid measures in snake bite. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91 (1997), 857-865.

**Alejandro Alagón, MD, PhD**  
**Institute of Biotechnology / Universidad**  
**Nacional Autónoma de México**  
**Cuernavaca, México (UNAM)**  
**Av University # 2001,**  
**Col. Chamilpa CP 62210**  
**Cuernavaca, Morelos, México**  
**alagon@ibt.unam.mx**