

Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación

**EFECTO DE LA ALTERIDAD DE LOS ANTICUERPOS
EQUINOS SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE LOS
ANTIVENENOS OFÍDICOS**

Alicia Rojas Araya

Tutor:

Guillermo León Montero, PhD

Comité revisor:

José María Gutiérrez Gutiérrez, PhD

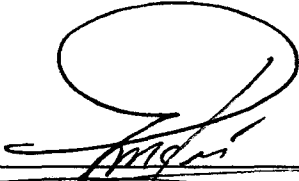
Bruno Lomonte Vigliotti, PhD

Julio, 2011

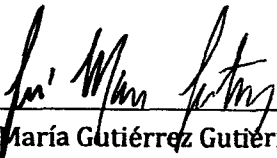
28 de julio del 2011

ACTA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

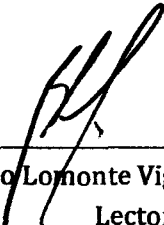
Por medio de la presente, se hace constatar que la estudiante de licenciatura de Microbiología y Química Clínica, Ana Alicia Rojas Araya carné A54832, se le ha aprobado el Trabajo Final de Graduación "Efecto de la alteridad de los anticuerpos equinos sobre la farmacocinética del antiveneno ofídico" por el Tribunal Evaluador.




Guillermo León Montero PhD
Tutor



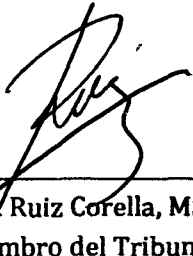
José María Gutiérrez Gutiérrez, PhD
Lector



Bruno Lonmonte Vigliotti, PhD
Lector



Marietta Flores Díaz, PhD
Miembro del Tribunal



Max Ruiz Corella, MSc
Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

A Dios

Por regalarme la vida y la oportunidad de cumplir uno de mis sueños

A mi familia

Por enseñarme los valores del esfuerzo, el trabajo y la dedicación

A Ricardo

Por sus infinitas palabras de ánimo

AGRADECIMIENTOS

A Memo,

Por la guía, el apoyo y la amistad

A María, Mariángela, Andrés, Maureen, Alvaro, Laura, Edu, Maykel, Christian, Melvin

Por todos los momentos compartidos científicos y no tan científicos

A Nils

Por su gran disposición a colaborar en el proyecto

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Tabla de Contenidos	v
1. Antecedentes.....	1
1.1 Serpientes de Costa Rica.....	1
1.2 Aspectos epidemiológicos del ofidismo.....	2
1.3 Aspectos clínicos del envenenamiento ofídico.....	3
1.4 Composición de los venenos de serpiente	4
1.5 Antivenenos ofídicos.....	6
1.6 Farmacocinética de los antivenenos.....	9
2. Hipótesis	14
3. Justificación	14
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo General	15
4.2 Objetivos Específicos	15
5. Materiales y Métodos	16
5.1 Antiveneno	16
5.2 Animales.....	16
5.3 Anticuerpos de conejo anti-IgG equina	16
5.4 Comportamiento farmacocinético del antiveneno de origen equino	17
5.4.1 Modelo leporino.....	17
5.4.2 Modelo Vacuno y Equino.	17
5.5 Cuantificación de anticuerpos equinos	17
5.5,1 Muestras de conejo, vaca y caballo	17

5.6 Análisis farmacocinético.....	18
5.7 Análisis Estadístico.....	20
6. Resultados.....	21
6.1 Efecto de la alteridad del antiveneno equino en modelo leporino, vacuno y equino.....	21
6.2 Efecto de la alteridad de los anticuerpos equinos sobre la farmacocinética del antiveneno ofídico.....	23
7. Discusión.....	27
7.1 Efecto de la alteridad de los anticuerpos equinos sobre la absorción del antiveneno.....	28
7.2 Efecto de la alteridad de los anticuerpos equinos sobre la distribución del antiveneno.....	30
7.3 Efecto de la alteridad de los anticuerpos equinos sobre la eliminación del antiveneno.....	33
7.4 Efecto de la especie sobre la farmacocinética de anticuerpos heterólogos.....	35
8. Conclusiones.....	37
9. Recomendaciones.....	38
10. Referencias.....	39

1. ANTECEDENTES

El accidente ofídico es un problema que enfrentan en la actualidad muchos países tropicales y subtropicales alrededor del mundo. La mayoría de las investigaciones epidemiológicas y clínicas giran alrededor del accidente ofídico en humanos, siendo el campo animal el sector al que menos se le ha prestado atención. La producción de antivenenos ha logrado disminuir las tasas de mortalidad a causa del ofidismo en las últimas décadas. No obstante, todavía se mantienen vacíos de conocimiento para optimizar la administración de los mismos en el ser humano y animales.

1.1 SERPIENTES DE COSTA RICA

Debido a sus características físicas y climáticas, Costa Rica es uno de los países del mundo con más alta diversidad biológica por km². En este escenario, los reptiles representan un porcentaje importante de la fauna vertebrada del país (Solórzano, 2004). Se han registrado 22 especies de serpientes venenosas pertenecientes a las familias Elapidae y Viperidae, de las cuales trece especies son consideradas endémicas (Solórzano, 2004).

Dentro de los Elápidos de Costa Rica, se encuentran 6 especies de serpientes: una del género *Pelamis* y cinco del género *Micrurus*. La especie *Pelamis platurus* es la única serpiente marina de Costa Rica y de la costa oeste de América y pertenece a la subfamilia Hydrophiinae. También, están presentes las especies *Micrurus alleni*, *M. clarki*, *M. mipartitus*, *M. mosquitensis* y *M. nigrocinctus*. De estas, cuatro poseen un patrón de coloración tricolor (negro, rojo y blanco o amarillo) y solo *M. mipartitus* posee un patrón bicolor (rojo, anaranjado, rosado o blanco y negro) (Solórzano, 2004).

La familia Viperidae está representada por 16 especies pertenecientes a los géneros *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothrops*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Porthidium*. La especie *Bothrops asper* es la más importante en Costa Rica ya que se le acredita la mayor cantidad de envenenamientos debido a su amplia distribución en el país, a su gran capacidad adaptativa y a su alta proliferación de hasta 90 crías por parto (Rojas *et al.*, 1997; Sasa y Vásquez, 2003; Fernández y Gutiérrez, 2006). La cascabel neotropical o *Crotalus simus* está ampliamente distribuida en América, sin embargo, en Costa Rica habita principalmente en la provincia de Guanacaste. La *Lachesis stenophrys* o Matabuey se localiza en áreas boscosas

protegidas en la vertiente Atlántica, debido a su estrecha relación con la selva húmeda inalterada (Guyer *et al.*, 2004).

1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL OFIDISMO

El ofidismo se define como el estado patológico producto de la mordedura de una serpiente a un humano o animal. Actualmente, el envenenamiento ofídico constituye un problema olvidado que requiere de especial atención por parte de las entidades mundiales de salud (Gutiérrez, 2006). Un análisis efectuado en el 2008, revela que mundialmente ocurren cerca de 421 000 envenenamientos y 20 000 muertes al año a raíz del ofidismo. La mayor problemática se concentra en las áreas del Sur y Sudeste asiático. A pesar de que en Centro y Suramérica se produce cerca de un cuarto del total de casos en el mundo, en esta zona la mortalidad es menor debido a un adecuado tratamiento. La mayoría de los envenenamientos ocurren en la población rural, en personas dedicadas a la agricultura (Kasturiratne *et al.*, 2008).

Dentro del continente americano, es difícil conocer la cantidad exacta de casos que ocurren por año, ya que no en todos los países se cuenta con registros completos. Aunada a esta situación, no todos los pacientes acuden a centros de salud posterior al accidente y además, la mayoría de los casos ocurren en zonas rurales, lo cual dificulta el proceso de registro y el mantenimiento de los mismos. Es por esto que se considera que el número real de casos de envenenamiento es mayor al estimado (Kasturiratne *et al.*, 2008).

En Costa Rica, el ofidismo constituye un evento de notificación obligatoria al Ministerio de Salud desde 1997, hecho que ha permitido la obtención de información epidemiológica confiable (Sistema Nacional de la Vigilancia de la Salud en Costa Rica, 2003). Según los estudios, se atienden entre 500 a 600 casos de envenenamientos humanos al año, siendo la incidencia de 15,6 casos por cada 100 000 habitantes (Rojas *et al.*, 1997; Sasa *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006), y de 1993 al 2006 han ocurrido 48 muertes (Fernández *et al.*, 2006). Tanto el número de casos por envenenamiento, así como las muertes a causa de los mismos, se concentran en las provincias de Puntarenas y Limón, se presentan en hombres jóvenes, en razón 5:1 con respecto a mujeres, dedicados a actividades agrícolas (Fernández *et al.*, 2006).

Por otro lado, el ofidismo en animales representa un desafío en cuanto a la obtención de información, ya que muy pocos estudios se han llevado a cabo en esta población. En el 2007, un estudio reveló que el número de accidentes ofídicos reportados en animales domésticos en Costa Rica, es de 106 en 6 meses, donde el 56% se dio en caninos, el 27% en bovinos, el 11% en equinos y el 6% en felinos. Se determinó también, que la mayor incidencia de envenenamientos ocurre entre octubre y febrero (Fernández, 2007).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DEL ENVENENAMIENTO OFÍDICO

Los signos y síntomas de una intoxicación dependen de la especie que haya provocado el envenenamiento. Esta situación se debe a las diferencias en la composición del veneno entre familias así también por algunos factores intrínsecos del animal como la edad, sexo y estado nutricional, hormonal y reproductivo. Además, la susceptibilidad al envenenamiento suele diferir entre las especies de animales domésticos así como de seres humanos. Se reporta que los animales más sensibles al veneno son los bovinos, le siguen los equinos, los ovinos, caprinos, los suinos y por último los felinos (Ferreira *et al.*, 2004).

La manera de diagnosticar un envenenamiento por ofidios se basa en la clínica, ya que en pocos casos el dueño del animal lleva consigo la serpiente que causó el accidente o estuvo presente durante la mordedura. Asimismo, las marcas de los colmillos no son siempre evidentes ni tampoco el daño local en lugar de la mordedura (Fernández, 2007).

El veneno de los miembros de la familia Viperidae induce una serie de alteraciones locales en el sitio de inyección del veneno, y sistémicas dada por la circulación del veneno a partir de lugar de la mordedura (Villalobos, 2008). La mayoría de las investigaciones en el país se han concentrado en los componentes y actividad biológica del veneno de *B. asper*, debido a que esta especie se acredita de más del 50% de los accidentes en humanos. La intoxicación conlleva a un conjunto de fenómenos locales como mionecrosis, dermonecrosis, hemorragia y edema (Gutiérrez *et al.*, 1998). Dentro de los efectos sistémicos están coagulopatía, hemorragia, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Rucavado *et al.*, 2000).

Por otro lado, el envenenamiento producido por especies de la familia Elapidae, conlleva a daños neurológicos, cardiotóxicos, hemolíticos y miotóxicos. La muerte generalmente se da por fallo respiratorio. Algunos de los efectos locales reportados en

pacientes mordidos por serpientes del género *Micrurus* son: parestesia, dolor, eritema, mialgia y edema ligero. Dentro de las manifestaciones sistémicas está la debilidad, la ptosis palpebral, visión borrosa, diplopia, inhabilidad para ponerse en pie, dolor de cabeza, mialgia, salivación, disfagia, entre otros (Bucaretschi *et al.*, 2006). En animales, la intoxicación por elápidos es más difícil de interpretar porque los signos pueden traslaparse con otras patologías (Villalobos 2008).

1.4 COMPOSICIÓN DE LOS VENENOS DE SERPIENTE

En el veneno existen varios tipos de miotoxinas a las que se les ha clasificado como fosfolipasas básicas A2 de la clase II. Estas proteínas actúan sobre la membrana celular de miocitos principalmente, llevando a un desbalance iónico por la salida de calcio de éstas y a la necrosis del tejido muscular (Gutiérrez *et al.*, 1995). La necrosis cutánea y muscular se evidencia por el cambio de la coloración de la piel y otros estratos córneos. Al inicio la piel es eritematosa, luego se torna violácea y por último toma color negro. Una de las complicaciones más frecuentes de las lesiones necróticas es la infección por agentes bacterianos ambientales o provenientes de la microbiota oral de la serpiente. La necrosis muscular puede llevar a la pérdida permanente del tejido, a la incapacidad o hasta la amputación del miembro afectado (Ferreira *et al.*, 2004).

Una serie de proteínas presentes en el veneno, llamadas metaloproteinasas dependientes de Zn^{+2} , son responsables de la hemorragia observada durante los envenenamientos por vipéridos. Algunas de estas enzimas alteran componentes importantes de la matriz extracelular y proteínas celulares necesarias para la adhesión intercelular y célula-matriz, que alteran y debilitan el lecho vascular, llevando a la separación de las células endoteliales de la membrana basal (Gutiérrez *et al.*, 2005). La BaH1, al contacto con el endotelio vascular *in vitro*, forma espacios entre las células, sin afectar la viabilidad de las mismas (Lomonte *et al.*, 1994; Borkow *et al.*, 1995). Las metaloproteinasas no solo llevan a la hemorragia, sino también contribuyen al edema, a la mionecrosis y al daño en la piel (Rucavado *et al.*, 2000). La hemorragia puede evidenciarse en el lugar de la mordedura, pero también pueden observarse a nivel nasal, en la boca, en la piel, en tejido subcutáneo o en la cavidad torácica y abdominal en casos severos (Ferreira *et al.*, 2004). El animal puede presentar melena, hematemesis y hematuria. A nivel histopatológico en muestras post-

mórtem, las hemorragias se evidencian en tejido renal y pulmonar, y macroscópicamente como petequias y equimosis en corazón, vejiga y otros órganos (Villalobos, 2008).

Otras toxinas actúan sobre los elementos de la cascada de la coagulación produciendo coagulopatías. La basparina A, una metaloproteinasa del tipo P-III, interactúa con la protrombina y la activa, dando a lugar a la formación de coágulos de fibrina con los eritrocitos. La formación de microtrombos en la circulación tiene como consecuencia el consumo del fibrinógeno sanguíneo (defibrinogénación) y la posterior activación del sistema fibrinolítico lo que conlleva a la aparición de productos de degradación del fibrinógeno (White, 2005). Por su parte, la asperasa es una serin proteinasa con actividad de trombina presente en baja concentración en el veneno de *Bothrops asper*. *In vitro* induce la coagulación del plasma y de fibrinógeno, e *in vivo* lleva a la defibrinogénación (Pérez *et al.*, 2008). El aumento en el tiempo de coagulación es una característica que se presenta en la mayoría de los animales mordidos. La coagulación intravascular diseminada puede llevar a embolismo pulmonar debido al transporte de los microtrombos formados durante la etapa procoagulante del paciente. Los coágulos potencialmente llevan a necrosis isquémica de tejidos como riñón y meninges (Milani *et al.*, 1997).

La aspercetina, una lectina del tipo C, ha sido asociada con la trombocitopenia. Esta toxina media la interacción del factor von Willebrand con el receptor plaquetario gpIb, de manera que induce la agregación y aglutinación de las plaquetas y potencia la hemorragia local (Rucavado *et al.*, 2001; Rucavado, 2006). El edema se debe a un conjunto de fenómenos inducidos por metaloproteinasas, miotoxinas del tipo I, II y III (fosfolipasas A₂), productos de eicosanoides y a la activación de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 (Chaves *et al.*, 1995, 1998; Badilla *et al.*, 2004). La extravasación de fluido provoca el aumento de la presión intersticial en compartimentos musculares llevando a isquemia y necrosis del tejido. Asimismo, el edema prolongado es producto del daño en vasos linfáticos, lo que conlleva a la incapacidad de equilibrar el fluido intersticial y la formación de linfa (Mora *et al.*, 2008). La víctima del accidente presentará tumefacción y dolor en el sitio de la mordedura durante los primeros minutos posteriores al accidente (Villalobos, 2008).

La disminución masiva del volumen sanguíneo, la vasodilatación y el daño directo en el miocardio induce, en casos severos, choque cardiovascular (Gutiérrez *et al.*, 2006). La insuficiencia renal aguda ocurre como consecuencia del choque, la coagulación intravascular diseminada y de la hipotensión que conllevan a una disminución en la perfusión renal y daño

isquémico (Chugh *et al.*, 1975; Sitprija, 2006). A las pocas horas posteriores al envenenamiento, se produce la necrosis tubular, que coincide con los valores más altos de creatin-kinasa, creatinina y urea en sangre. En algunas especies de *Bothrops*, se ha descrito la nefrotoxicidad directa que ejercen los venenos (Koscinczuk *et al.*, 2004).

Por otro lado, algunos de los venenos de elápidos tienen componentes que actúan a nivel presináptico, es decir, inhiben la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular. Sin embargo, otros venenos actúan a nivel post-sináptico, al tener proteínas no enzimáticas que se unen de manera competitiva a los receptores nicotínicos de acetilcolina (Bucarechi *et al.*, 2006).

En el veneno de *Micrurus nigrocinctus*, están presentes la nigroxina A, B, C1, C2 y C3, las cuales son responsables de la mionecrosis del músculo esquelético. La nigroxina A y B son fosfolipasas A2 de la clase I que además de la miotoxicidad, conllevan al aumento de la enzima creatin kinasa en plasma como consecuencia de la degeneración celular a nivel del músculo esquelético (Gutiérrez *et al.*, 1986, Alape *et al.* 1999). Además, existen neurotoxinas que se unen a receptores nicotínicos para acetilcolina. Se distinguen dos clases de α -neurotoxinas, las de cadena larga y las de cadena corta (Rosso *et al.*, 1996). Estas proteínas inducen la despolarización de la membrana presináptica, pero aún más importante, tienen la capacidad de bloquear la transmisión neuromuscular llevando a parálisis periférica. (Goularte *et al.*, 1999).

1.5 ANTIVENENOS OFÍDICOS

Los antivenenos producidos en diferentes especies animales son la única herramienta terapéutica efectiva para neutralizar las toxinas durante un envenenamiento ofídico. La producción de antisueros ha ayudado a disminuir la tasa de mortalidad de los individuos que han sido víctimas de un accidente ofídico (Gutiérrez *et al.*, 1999). Además del suero antiofídico, como comúnmente se le conoce, resulta necesario la administración de fluidos para reponer el volumen sanguíneo perdido, antiinflamatorios, antibióticos y dependiendo del caso, la inyección de suero antitetánico. La combinación de estos fármacos y el tratamiento de soporte sirven para disminuir los efectos locales y sistémicos generados por el envenenamiento y así impedir complicaciones serias como la disfunción renal y respiratoria y la muerte (Gutiérrez *et al.*, 2006; Villalobos, 2008).

La historia de los antivenenos ofídicos se remonta hace más de un siglo, cuando en 1891 Emil von Behring elaboró un suero antitetánico y antidiftérico. En 1894, Paul Erlich desarrolló un protocolo de cuantificación y estandarización para determinar la calidad de las antitoxinas y así mejorar su eficacia (Grundmann, 2001; Linton, 2005). Fue en 1894 cuando Albert Calmette, un médico inmunólogo y bacteriólogo francés, se inspiró en el descubrimiento de von Behring y estudió formas de elevar el título de antitoxinas en suero de caballo, contra el veneno de cobra. Así fue como desarrolló el primer antisuero dirigido contra el veneno de una serpiente, *Naja naja*, al que se le llamó suero de Calmette (Hawgood, 1999). En 1898 Vital Brazil, preocupado por la alta incidencia de mordeduras y muertes a causa del envenenamiento ofídico, desarrolló el primer antiveneno efectivo contra venenos de especies de *Bothrops* y *Crotalus* (Barraviera, 1995).

Con el conocimiento que se tiene hoy día, se sabe que los antivenenos se producen al inyectar en un animal, una dosis determinada de veneno. El animal, como parte de su respuesta inmune, producirá anticuerpos contra las proteínas extrañas inyectadas. Los anticuerpos generados tendrán especificidad y afinidad alta o baja dependiente al grado de inmunogenicidad de la molécula administrada (Kindt *et al.*, 2007).

Los anticuerpos son moléculas proteicas constituidas por dos cadenas pesadas de 50 kDa y 2 cadenas livianas de 25 kDa, con peso molecular total de 150 kDa. Una cadena pesada se asocia a una cadena liviana y a otra cadena pesada por puentes disulfuro. Cada una de las cadenas posee una región constante y otra variable, que determina la especificidad de reconocimiento a un antígeno. Existen 5 tipos diferentes de inmunoglobulinas con funciones biológicas y propiedades distintas entre ellas (Kindt *et al.*, 2007). La producción natural de inmunoglobulinas en un organismo superior se da posterior al contacto de un antígeno determinado con los anticuerpos expuestos en la célula B. Este contacto permite la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. Se estima que la vida media de una inmunoglobulina tipo G en suero es de alrededor de 23 días (Lobo *et al.*, 2004).

Los antivenenos, en la mayoría de ocasiones, son elaborados a partir del fraccionamiento de plasma equino u ovino hiperinmune al veneno crudo. El plasma de varios individuos se junta y a partir de esta mezcla se separan los anticuerpos inmunoreactivos contra los componentes del veneno, ya sea para mantenerlo como moléculas completas o para digerirlo enzimáticamente para obtener fragmentos Fab o F(ab')₂ (Burnouf *et al.*, 2004). Los

fragmentos Fab de 50 kDa se producen a partir de la reacción de las IgG completas con papaína y las porciones F(ab)₂ de 100 kDa después del uso de pepsina (Flanagan *et al.*, 2004).

En 1969, Steinbuch y Audrán estudiaron la purificación de inmunoglobulinas de diferentes especies por la adición de ácidos grasos de cadena corta. Posteriormente, el conocimiento obtenido en estos estudios fue aplicado para la purificación de anticuerpos dirigidos contra toxinas de veneno (Dos Santos *et al.*, 1989) y la formulación de una técnica para la producción industrial de antivenenos ofídicos (Rojas *et al.*, 1994).

En esta técnica, las proteínas no inmunoglobulinas son precipitadas por la adición de ácido caprílico y separadas por filtración. Los anticuerpos que se mantienen en solución son formulados con excipientes como osmolitos y preservantes, y son esterilizados por filtración a través de membranas con capacidad para exclusión de partículas con tamaños superiores a las 0,22 micras (Rojas *et al.*, 1994). Los antivenenos pueden ser distribuidos en dos formas farmacéuticas: i) líquidos, en cuyo caso deben mantenerse en refrigeración y tienen una vida útil de 3 años, y ii) liofilizados, los cuales tienen una vida útil de 5 años y pueden mantenerse a temperatura ambiente (Rojas *et al.*, 1990).

Un aspecto esencial sobre el cual gira la seguridad de los antivenenos, es el porcentaje de reacciones adversas tempranas y tardías que se producen a causa de la administración del producto terminado. El motivo exacto por el cual ocurren estas reacciones aún no se conoce. Sin embargo, se considera que las reacciones se deben a un conjunto de eventos, más que a un hecho aislado (Gutiérrez *et al.*, 2006). Se ha observado que algunos componentes adicionados al antisuero provocan reacciones adversas tempranas. El efecto del fenol como preservante en el antiveneno, se ha estudiado en modelos con roedores y se ha visto que este compuesto perturba la interacción entre los leucocitos y el endotelio. Además, conlleva a disnea, hipotensión y temblor, que son síntomas característicos de una reacción adversa temprana (García *et al.*, 2002, Zychar *et al.*, 2008).

Por otra parte, la actividad anticomplementaria (ACA) de los anticuerpos equinos ha sido relacionada con la ocurrencia de reacciones adversas tempranas posterior al tratamiento con inmunoglobulinas heterólogas. Hipotéticamente, la activación del complemento produce la liberación de anafilotoxinas que actúan sobre mastocitos y músculo liso, produciendo la sintomatología de la reacción. Por eso, se ha considerado que la remoción del fragmento Fc de las inmunoglobulinas mediante digestión enzimática, reduce la capacidad de las mismas para

activar el complemento por la vía clásica, producir anafilotoxinas e inducir reacciones tempranas. Alternativamente, se ha planteado que el origen de estas reacciones podría estar relacionado con la presencia de anticuerpos heterofílicos tanto en el plasma del paciente (León *et al.*, 2008) como en el antiveneno (León *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido demostrada en estudios clínicos. En todo caso, el desarrollo de reacciones adversas depende en gran proporción del proceso de purificación y de las propiedades físicoquímicas que posea el producto terminado más que por la naturaleza propia de las inmunoglobulinas (Gutiérrez, 2007).

1.6 FARMACOCINÉTICA DE LOS ANTIVENENOS

La farmacocinética es el área de la farmacología que se dedica al estudio de la disposición y actividad de una droga y/o sus metabolitos, en los diferentes fluidos, tejidos y excretas de un organismo. Este sector es de especial interés para el descubrimiento, desarrollo y optimización de un fármaco de uso humano y animal (Welling, 1997).

Los parámetros farmacocinéticos facilitan la comprensión del comportamiento de un compuesto dentro de un organismo. La biodisponibilidad es la porción de una droga administrada que llega a circulación sistémica y está disponible para actuar en su sitio de acción. Si la administración del compuesto se realiza por vía intravenosa (i.v.), la biodisponibilidad será del 100%, sin embargo, si el medicamento se administra por vía oral, intramuscular (i.m.) o subcutánea (s.c.), la biodisponibilidad tendrá un valor menor al 100%. (Pepin *et al.*, 1995; Welling, 1997). El volumen de distribución es el volumen comprendido entre el plasma y demás tejidos del cuerpo en el que una droga se equilibra para alcanzar la concentración plasmática observada. El tiempo de concentración máxima (t_{max}) es el tiempo que necesita un compuesto en alcanzar la concentración máxima ($C_{n_{max}}$) del medicamento en plasma. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de una droga es el tiempo que requiere la misma para perder la mitad de su actividad farmacológica. El aclaramiento es la tasa en la cual una sustancia está siendo removida del cuerpo (Welling, 1997).

Los métodos más empleados para la cuantificación de anticuerpos o fragmentos de ellos en los estudios farmacocinéticos de antivenenos, son el ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), el IRMA (del inglés *immunoradiometric assay*) y el marcaje radioactivo de anticuerpos (Pépin-Covatta *et al.*, 1996; Bazin-Redureau *et al.*, 1998; Ismael *et al.*, 1998;

Gutiérrez *et al.*, 2003). En la mayoría de estos ensayos se emplean animales distintos al animal de origen del antisuero, por ejemplo, se emplean ratones, ratas y conejos para estudiar el comportamiento de un antiveneno de origen equino (Bazin-Redureau *et al.*, 1998).

En la mayoría de las investigaciones efectuadas sobre el comportamiento de los antivenenos, se ha obtenido que estos siguen una distribución de un modelo bicompartimental, es decir, que se distribuyen entre un compartimento central y un compartimento tisular (Pépin-Covatta *et al.*, 1995; Pépin-Covatta *et al.*, 1996; Rivière *et al.*, 1997). El compartimento central está constituido por agua plasmática, agua intersticial y agua intracelular en tejidos muy irrigados y por eso, fácilmente accesibles (por ejemplo corazón, pulmón, hígado, riñón, glándulas endocrinas y sistema nervioso central). A la vez, el compartimento tisular superficial está compuesto por agua intracelular poco accesible como la de la piel, grasa, músculo y médula ósea (Dhillon *et al.*, 2006). En otros estudios se describe un modelo tricompartmental que involucra un compartimento central, un compartimento tisular superficial y el compartimento tisular profundo (Ismail *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1998), el cual incluye los depósitos tisulares a los que el fármaco se une más fuertemente y de los que, por tanto, se libera con mayor lentitud.

Los antivenenos de inmunoglobulinas completas o fragmentos Fab y F(ab')₂, poseen un comportamiento farmacocinético y farmacodinámico distinto entre ellos. El peso molecular de estas proteínas juega un papel importante que ayuda a explicar muchas de las propiedades que se demuestran *in vivo*. Aquellos que son elaborados con Fab de 25 kDa, son aclarados rápidamente del cuerpo a diferencia de las F(ab')₂ de 50 kDa e IgG de 150 kDa, debido a las diferencias en su peso y a la vía de eliminación (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Los fragmentos Fab, tienen mayor capacidad de difundirse entre los capilares y el fluido intersticial de varios órganos como el pulmón y bazo. Un experimento enfocado en el movimiento transcapilar (PS) de las inmunoglobulinas, reveló que a menor el tamaño del anticuerpo, mayor es el coeficiente PS. El hígado es la excepción, debido a que posee una afinidad mayor por las IgG. En este órgano se observa que existen otras propiedades distintas al peso molecular que conllevan a la extravasación de las inmunoglobulinas (Covell *et al.*, 1986).

La administración intravenosa de un antiveneno conlleva a la máxima biodisponibilidad de los anticuerpos y por lo tanto, los mejores resultados en cuanto a la neutralización del veneno. Por otro lado, la administración intramuscular de un antiveneno

involucra una absorción más baja de las moléculas, un T_{max} de mayor magnitud y una menor biodisponibilidad. Estos datos son consistentes con el hecho que la mayoría de proteínas de alto peso molecular son liberadas lenta y parcialmente desde el sitio de inyección vía i.m. o s.c. Un antiveneno que sea aplicado por estas vías será menos eficaz debido a la absorción y modificación que sufren las inmunoglobulinas. Esto trae como consecuencia que una menor porción del antiveneno total aplicado sea capaz de efectuar su actividad neutralizante hacia las toxinas (Pépin *et al.*, 1995; Pépin *et al.*, 1996).

La acumulación del veneno en tejidos es mayor que la de las inmunoglobulinas, hecho que se refleja en los tiempos medios de residencia en tejidos y sangre. Los anticuerpos poseen mayor tiempo de residencia en la sangre (MRT_c) y el veneno mayor residencia en los tejidos (MRT_t), esto se traduce en una mayor afinidad de las inmunoglobulinas por el compartimento central y de las toxinas hacia sus moléculas blanco tisulares (Ismail *et al.*, 1998). Los efectos locales inducidos por el veneno de *Bothrops asper* serán menores si los anticuerpos neutralizan rápidamente a las toxinas. Aunque teóricamente, esto sería más fácil de obtener en el caso de la administración de un antiveneno Fab o $F(ab')_2$, debido a que poseen mayor volumen de distribución que las IgG, la evidencia experimental demuestra que en general, la neutralización de los efectos locales y sistémicos producidos por el veneno de *Bothrops asper* es similar independientemente de la molécula que el antiveneno emplee como sustancia activa (León *et al.*, 1997; 2000; 2001).

Posterior a la inmunoterapia aplicada en los animales que sufren un envenenamiento inducido vía i.m., se observa un aumento en la concentración de las toxinas en sangre, a este fenómeno se le conoce como redistribución del veneno inducida por anticuerpos. Cuando se "rescata" al animal con la aplicación del antiveneno vía i.v., las toxinas viajan desde el espacio extravascular hasta el compartimento intravascular y se inmunocomplejan los antígenos en la sangre (Riviére *et al.*, 1997, 1998). La redistribución de las toxinas se debe principalmente a la unión reversible y la cinética de eflujo de la toxina desde su tejido blanco, a la dosis del antiveneno y de la constante de afinidad del inmunocomplejo (Gutiérrez *et al.*, 2003, Pépin-Covatta *et al.*, 1996; Scherrmann, 1995; Scherrmann, 2000). En el caso en que un veneno lleve a efectos neurotóxicos, el antiveneno será más exitoso si logra redistribuir las toxinas antes de que las mismas provoquen un daño irreversible al organismo. Sin embargo, si las toxinas provocan hemorragia o mionecrosis, la redistribución inducida por anticuerpos conllevará a

más daño irreversible en los tejidos al inducirse un contacto adicional con las moléculas blanco (Gutiérrez *et al.*, 2003).

El empeoramiento del paciente posterior a la mejora inicial de los síntomas de envenenamiento debido a la administración de antiveneno, es lo que se conoce como recurrencia de envenenamiento (Seifert *et al.*, 2001). Este fenómeno se observa con mayor frecuencia en individuos que reciben una dosis única inicial de antiveneno Fab que aquellos en los que se aplican dosis adicionales (Dart *et al.*, 2001). Esto se ha asociado con: i) la caída abrupta en la concentración del antiveneno; ii) la recurrencia de los síntomas puede deberse a que la cantidad de veneno inyectada por la serpiente es mayor a la que puede ser neutralizada por la dosis de antiveneno administrada (Gutiérrez *et al.*, 2003); iii) la rápida tasa de eliminación de los fragmentos Fab en particular, contribuye a que la neutralización de las toxinas sea incompleta, de esta manera, quedan proteínas potencialmente dañinas (Dart *et al.*, 2001); iv) es posible que la constante de afinidad en el complejo anticuerpo/toxina sea muy baja, lo que lleva a la fácil disociación con el veneno; v) la producción, en el paciente, de anticuerpos anti-inmunoglobulina administrada, pueden llevar a la interferencia de la unión entre el antiveneno y las toxinas (Dart *et al.*, 2001).

Los anticuerpos se eliminan de manera distinta de acuerdo a su peso molecular. Los Fab se eliminan por filtración glomerular, mientras que las IgG completas o $F(ab')_2$ deben ser metabolizadas previamente antes de excretarse (Pépin *et al.* 1996; Lobo *et al.*, 2004). En ratones, la mayor parte del catabolismo de las IgG toma lugar en el intestino (~73%), en el hígado (20.5%) y en el bazo (3.6%). Los $F(ab')_2$ son catabolizadas en riñón (50.3%) e intestino (43.3%) y los fragmentos Fab se catabolizan principalmente en riñón (73.4%) y en intestino (~23%) (Covell *et al.*, 1986).

La alta tasa de eliminación de los Fab provoca que, durante un envenenamiento, el antiveneno deba ser inyectado nuevamente para conservar la capacidad neutralizante de estos fragmentos. En cambio el antiveneno producido con $F(ab')_2$ o IgG no necesita una segunda administración debido a la naturaleza de las inmunoglobulinas de mantenerse más tiempo en el organismo. En estos términos, la eficacia de un antiveneno Fab es menor debido a su disminuida capacidad neutralizante en una sola dosis (Rivière *et al.*, 1998).

Una vez que los anticuerpos forman complejos inmunes, las tasas de eliminación varían. La capacidad de formar estos complejos es mayor para los fragmentos $F(ab')_2$ que

para los Fab. Además, los complejos Fab/veneno se eliminan más lento que las Fab libres en plasma, probablemente por el alto peso molecular del complejo que impide la eliminación renal. En el caso de los complejos $F(ab')_2$ y el veneno, la velocidad en la eliminación se da en el siguiente orden decreciente: i) veneno solo, ii) complejo $F(ab')_2$ /veneno, y iii) la $F(ab')_2$ libres (Riviére *et al.*, 1998).

Los mecanismos de eliminación de las inmunoglobulinas del compartimento central aún no se conocen con exactitud. Se asume que la caída abrupta en la concentración plasmática del antiveneno se debe a la extravasación de los anticuerpos hacia el compartimento tisular superficial. Se ha observado que la entrada de los anticuerpos hacia el compartimento tisular se debe al daño provocado por el veneno en el endotelio vascular (Batellino *et al.*, 2003). La hemorragia característica de un envenenamiento por vipéridos se da por la alteración de la integridad de la membrana basal del endotelio, que conlleva a la extravasación del fluido sanguíneo hacia el intersticio. Este hallazgo clarifica que el endotelio capilar debe haber perdido su integridad para que se puedan encontrarse inmunoglobulinas en el tejido intersticial (Battellino *et al.*, 2003). La cantidad de antiveneno en un tejido sometido experimentalmente a un envenenamiento es ligeramente mayor con respecto a un animal control, hecho que explica la poca diferencia en los parámetros farmacocinéticos entre animales envenenados y controles (Quesada *et al.*, 2006).

Se han descrito diferentes mecanismos en los cuales las inmunoglobulinas son removidas del compartimento central. Uno de ellos es el receptor Fc del neonato o FcRn, que reconoce la porción Fc de los anticuerpos y propicia su eliminación de la sangre (Israel *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 2000). El grado de inmunogenicidad de los anticuerpos es otro factor que podría estar involucrado en la eliminación de las IgG. Se ha observado que pacientes que reciben inyecciones periódicas de anticuerpos monoclonales de origen murino para el tratamiento distintas enfermedades, terminan produciendo anticuerpos anti-inmunoglobulinas murinas, HAMA (del inglés *Human anti-mouse antibody*). La cantidad producida depende de la inmunogenicidad del anticuerpo, de la dosis aplicada, el número de inyecciones que recibe y de características individuales del paciente. (Kuus-Reichel *et al.*, 1994). Los pacientes que reciben antiveneno posterior a un accidente ofídico también poseen anticuerpos heterofílicos que no solo podrían estar involucrados en la generación de reacciones adversas sino también, podrían explicar parte de la eliminación de los anticuerpos del compartimento central (León *et al.*, 2008).

2. HIPÓTESIS

La disminución abrupta de la concentración de antiveneno, que se observa inmediatamente después de su administración intravenosa en modelos heterólogos, puede estar relacionada con mecanismos inmunológicos de remoción activa de los anticuerpos equinos, más que con su difusión pasiva entre compartimentos corporales.

3. JUSTIFICACIÓN

La administración de antivenenos constituye la única herramienta eficaz para tratar el envenenamiento producido por la mordedura de serpientes. El estudio del comportamiento farmacocinético del antiveneno resulta fundamental porque al conocer las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción del antiveneno, pueden adoptarse medidas para mejorar la dosificación o modificar el esquema de aplicación del producto.

El análisis de la farmacocinética de los antivenenos, tradicionalmente se ha efectuado en modelos heterólogos y se ha asumido que la disminución en la concentración del antiveneno que se observa inmediatamente después de su administración se debe a la extravasación de los anticuerpos al intersticio, dejando a un lado las implicaciones inmunológicas que existen por la alteridad de los anticuerpos que constituyen el antiveneno. Por lo tanto, el conocimiento actual de la farmacocinética se ha fundamentado en investigaciones que dejan a un lado la inmunología intrínseca de cada organismo.

La presente tesis de investigación busca ampliar el conocimiento sobre la farmacocinética del suero antiofídico producido en el Instituto Clodomiro Picado, empleando los modelos leporino, vacuno y equino. Si la extravasación es el único mecanismo de eliminación, los tres modelos animales utilizados durante la investigación, presentarán curvas farmacocinéticas similares.

Una vez que haya un mayor conocimiento sobre los mecanismos de eliminación de los anticuerpos, se podrán establecer medidas para mantenerlos durante más tiempo en sangre y eventualmente mejorar su efecto terapéutico.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las diferencias entre los parámetros farmacocinéticos de un antiveneno de origen equino, determinados en modelos heterólogos (leporino y vacuno) y en modelo homólogo (equino).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el comportamiento farmacocinético del suero antiofídico de origen equino en un modelo vacuno.
2. Estudiar el comportamiento farmacocinético del suero antiofídico de origen equino en un modelo leporino.
3. Estudiar el comportamiento farmacocinético del suero antiofídico de origen equino en un modelo equino.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANTIVENENO

El antiveneno empleado fue el lote 4000806LQ producido por el Instituto Clodomiro Picado, el cual es una preparación de inmunoglobulinas completas purificadas por precipitación con ácido caprílico (Rojas *et al.*, 1994), a partir del plasma de caballos inmunizados con venenos de las serpientes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys* (Angulo *et al.*, 1997). La concentración de proteínas del producto fue de 5.74 ± 0.10 g/dL. El antiveneno empleado para la inmunización de los conejos se produjo del mismo modo citado anteriormente, sin embargo fue del lote 3651003LQ y la concentración final de proteínas fue de 4.70 ± 0.10 g/dL.

5.2 ANIMALES

Los experimentos de farmacocinética fueron realizados empleando como modelos conejos de la raza Nueva Zelandia, vacas de la raza Jersey y caballos criollos costarricenses. Las vacas fueron proveídas por la Estación Experimental de Ganado Lechero Alfredo Volio Mata (EEAVM) y los conejos y caballos por el Instituto Clodomiro Picado. Todos los procedimientos empleados en este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales de Laboratorio (CICUA) de la Universidad de Costa Rica (Proyecto 82-08) y cumplen con los principios de la Guía Internacional para la Investigación Biomédica que Involucra Animales (CIOMS, 1986).

5.3 ANTICUERPOS DE CONEJO ANTI-IGG EQUINA

Los anticuerpos anti-IgG equina se obtuvieron a partir de la inmunización de dos conejos cada 15 días durante 2 meses. En la primera dosis se administraron 3 mL vía subcutánea de una suspensión de antiveneno (Ver Sección 5.1 Antiveneno) en adyuvante de Freund completo. Las siguientes dosis aplicadas se prepararon con adyuvante de Freund incompleto. Las inmunoglobulinas anti-IgG equinas fueron purificadas por precipitación con ácido caprílico a partir del plasma de los conejos.

5.4 COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO DEL ANTIVENENO DE ORIGEN EQUINO

5.4.1 MODELO LEPORINO.

Se contó con 8 conejas de aproximadamente 3 kg de peso cada una. Se dividieron en 2 grupos de cuatro animales cada uno. A todos los conejos se les extrajo una muestra basal de sangre antes de iniciar el experimento. Al primer grupo se le inyectó un bolo intravenoso de 1 mL/kg de antiveneno de origen equino en la vena marginal de la oreja. Posteriormente, se les tomó muestras de sangre a los minutos 1, 5, 15, 30, 60, 180, 360, 720, 1440, 2880, 5760, 7200, 8640 y 10080. Las muestras se dejaron coagular y se separó el suero del paquete celular por medio de centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm. Las muestras se almacenaron a -4 °C hasta su análisis.

Al segundo grupo de conejos se les inyectó 0,8 mL/kg de suero de conejo anti-IgG equina. Se esperó cinco minutos y al cabo de este tiempo se le inyectó un bolo intravenoso de 1 mL/kg de antiveneno y se continuó el experimento de modo similar al primer grupo.

5.4.2 MODELO VACUNO Y EQUINO.

Se contó con 5 vacas adultas de aproximadamente 300 kg de peso cada una y 4 yeguas adultas de aproximadamente 300 kg de peso cada una. De cada animal se tomó una muestra de sangre basal obtenida de la vena yugular izquierda. Posteriormente, a cada animal se le inyectó un bolo intravenoso en la vena yugular izquierda de 100 mL de antiveneno (Ver sección 5.1 de Materiales y Métodos). Posteriormente, a cada animal se le extrajo muestras de sangre a partir de la vena yugular izquierda a los minutos 1, 5, 15, 30, 60, 180, 2880, 10080, 12960, 20160 y 30240.

Posteriormente, las muestras de sangre se dejaron coagular, el suero se separó por centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm y almacenó a -4°C hasta su análisis.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS EQUINOS

5.5.1 MUESTRAS DE CONEJO, VACA Y CABALLO

Se realizó un ELISA usando fosfatasa alcalina como medio revelador. Se recubrió una placa de 96 hoyos con veneno de *Bothrops asper* (Atlántico + Pacífico) a una concentración de

0,03 mg/mL por hoyo. Se incubó la placa durante la noche a temperatura ambiente y se lavó 10 veces con agua. Se preparó una curva de calibración con suero antiofídico polivalente antibotrópico, anticrotálico y antilaquéstico del lote 4000806LQ, empleando como disolvente albúmina bovina al 2% en amortiguador NaCl 0,15M, Tris 0,1M y pH 9,0 (Alb2% Tris). Las muestras de suero de conejo se diluyeron 1:300 en Alb2%. Se depositó 100 µL de cada muestra en la placa por triplicado. Se incubó durante 60 minutos y se lavó. Se agregó 100 µL de anticuerpos de cabra anti IgG equina marcados con fosfatasa alcalina (diluido 1:1000 en Alb2%Tris). Se incubó durante 60 minutos, se lavó y se reveló con p-nitrofenil fosfato (Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO). La reacción se detuvo con una solución de hidróxido de sodio 2 M. El color desarrollado se midió con el espectrofotómetro Dynatech MR5000 a 410 nm. La concentración de antiveneno se expresó como µL de anticuerpos antiveneno por mL de suero de conejo.

Las muestras obtenidas en el modelo vacuno fueron diluidas 1/300 empleando como disolvente una solución de albúmina al 2% disuelta en un amortiguador NaCl 0,12M, fosfatos 0,04M y pH 7.2 (Alb2%PBS). Además, como conjugado se empleó anticuerpos de conejo anti-IgG equina marcados con peroxidasa diluidos 1/1000 con Alb2%PBS, y como cromógeno se empleó 1,2-fenilendiamina (OPD). La reacción se detuvo con 50 µL de una solución de ácido clorhídrico 2 M. La absorbancia del color desarrollado se midió a una longitud de onda de 490 nm y la concentración de antiveneno se expresó como µL de anticuerpos antiveneno por mL de suero vacuno.

Por su parte, las muestras obtenidas en el modelo equino fueron analizadas mediante una técnica similar a la empleada para las muestras del modelo vacuno con las siguientes modificaciones: i) las muestras del modelo equino fueron diluidas 1/100 en Alb2%PBS; ii) la curva de calibración se preparó diluyendo el antiveneno lote 4000806LQ en suero equino normal diluido 1/100 en Alb2%PBS; y iii) el conjugado se empleó diluido 1/2000 con Alb2%PBS. La concentración de antiveneno se expresó como µL de anticuerpos antiveneno por mL de suero equino.

5.6 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

La concentración plasmática de antiveneno (µL de suero antiofídico/mL de plasma) vs. tiempo (min) se empleó para trazar una curva farmacocinética. Se emplearon dichos datos

para calcular algunos parámetros farmacocinéticos basados en un modelo no compartimental. Los tres modelos animales se analizaron por este modelo.

La concentración máxima en plasma (Cn_{max}) y el t_{max} se determinaron a partir de la curva farmacocinética.

El cálculo del área bajo la curva de todos los puntos muestreados (AUC_{all}) se efectuó por medio de integración por trapezoides (1). A partir de la fórmula (1) se obtuvo la fórmula (2) sustituyendo los valores por concentraciones obtenidas y tiempos de muestreo.

(1)

$$AUC_{all} = \sum \frac{(B + b)}{2} \times h$$

(2)

$$AUC_{all} = \sum \frac{(Cn_2 + Cn_1)}{2} \times t_2 - t_1$$

La constante de eliminación (k_{el}) se obtuvo con el cálculo de la pendiente de la curva farmacocinética (3) (Shargell *et al.*, 1999).

(3)

$$k_{el} = \frac{\ln(Cn_2 - Cn_1)}{t_2 - t_1}$$

El área bajo la curva extrapolado al infinito (AUC_{∞}) se determinó a partir de los valores obtenidos en la fórmula (2) y (3), y la concentración plasmática de antiveneno del último punto de la curva (Cn_{last}).

(4)

$$AUC_{\infty} = \frac{AUC_{all} + Cn_{last}}{|k_{el}|}$$

Se calculó un porcentaje de correspondencia entre el AUC_{all} y el AUC_{∞} para obtener el porcentaje de la dosis muestreada en el experimento (D_m)

(5)

$$D_m = \frac{AUC_{all}}{AUC_{\infty}} \times 100$$

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) se calculó con el uso de la fórmula (6).

(6)

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$$

El volumen de distribución (V_d) se obtuvo partiendo de la dosis de antiveneno administrada (D) y de la concentración plasmática de antiveneno expresada en $\mu\text{L}/\text{mL}$ de plasma.

(7)

$$V_d = \frac{D}{k_{el} \times AUC_{all}}$$

El aclaramiento del antiveneno (Cl) fue calculado de la siguiente manera:

(8)

$$Cl = V_d \times k_{el}$$

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Las diferencias observadas en los parámetros farmacocinéticos determinados en los diferentes modelos fue evaluada mediante la prueba de t de student de dos colas, considerando significativos los valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Los animales del experimento no demostraron signos de hipersensibilidad asociados a la administración del anti-veneno. No se observaron signos de malestar, edema o eritema posterior a la extracción de cada muestra de sangre.

6.1 EFECTO DE LA ALTERIDAD DEL ANTIVENENO EQUINO EN MODELO LEPORINO, VACUNO Y EQUINO.

Las concentraciones de anti-veneno detectada en cada modelo animal se normalizaron con la concentración en el tiempo cero.

El Gráfico 1 expone las curvas obtenidas en modelo leporino sobre el comportamiento del antiveneno de origen equino, tanto en presencia de inmunoglobulinas anti-IgG equina (anti-IgGeq), como en ausencia de éstas. Se observa que hay una disminución en la concentración inicial del antiveneno en más del doble cuando existen anti-IgGeq. En ambos modelos, la concentración de antiveneno tiende a disminuir conforme pasa el tiempo. La concentración de antiveneno se equipara en ambos ensayos después de los 1000 minutos.

En el gráfico 2 se observa la diferencia en el comportamiento del antiveneno de origen equino entre los modelos vacuno y equino. En el modelo equino puede apreciarse una pendiente positiva en los primeros dos puntos de la curva. En cambio, en las vacas la concentración de antiveneno tiende a disminuir conforme pasa el tiempo al igual que el modelo leporino. La concentración del antiveneno se equipara en el modelo vacuno y equino a partir de los 100 minutos de haberse administrado.

A diferencia del comportamiento observado en vacas y conejos, la curva del modelo equino presenta un ligero aumento en la concentración plasmática de antiveneno en los últimos puntos de muestreo.

Al comparar los cuatro modelos experimentales, las concentraciones iniciales más bajas se observaron en el modelo vacuno y en el modelo leporino con anti-IgGeq. Además, los modelos heterólogo (vacuno y leporino) presentan comportamientos similares en cuanto a la disminución sanguínea del antiveneno, a diferencia del modelo homólogo (equino).

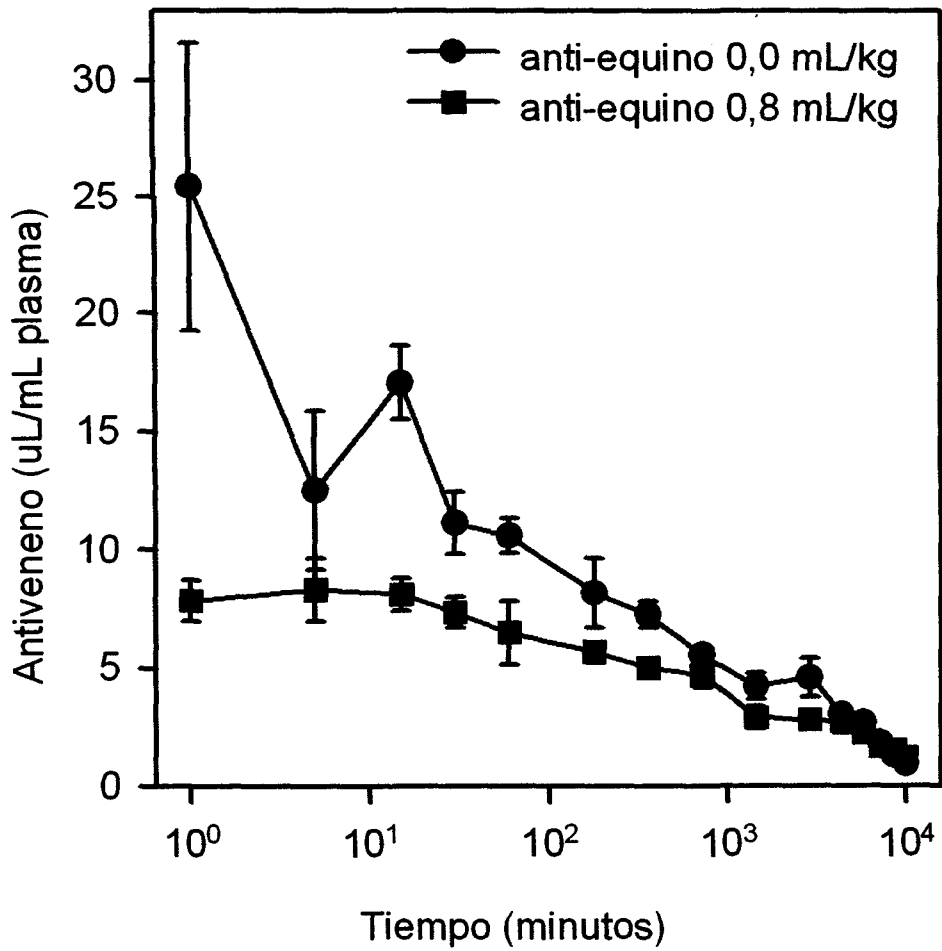


Figura 1. Curva farmacocinética de antiveneno polivalente de origen equino en modelo leporino, posterior a la administración de inmunoglobulinas anti-anticuerpos equinos.

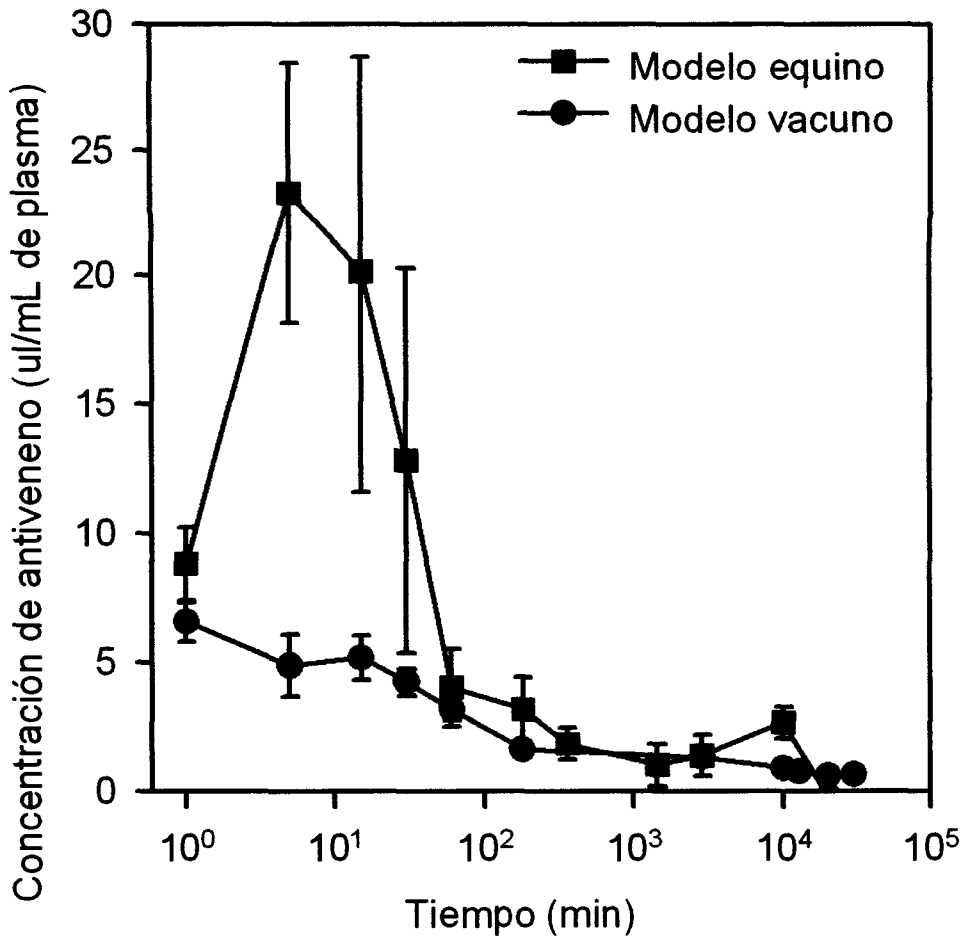


Figura 2. Curva farmacocinética de antiveneno polivalente de origen equino en modelo equino y vacuno.

6.2 EFECTO DE LA ALTERIDAD DE LOS ANTICUERPOS EQUINOS SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DEL ANTIVENENO OFÍDICO

Las curvas farmacocinéticas de cada modelo animal mostraron una pendiente negativa constante, como la observada en modelos monocompartimentales.

En modelo leporino se observa que el AUC_{all} es menor en el grupo que recibió anti-IgGeq que en los controles, aunque las diferencias no son significativamente diferentes ($p=0.08$). Por lo tanto, la biodisponibilidad del antiveneno no varía cuando se administran

anti-IgGeq en conejos. Lo anterior se reprodujo en el AUC_{all} de vacas y caballos, donde el primer grupo tiene menor AUC_{all} que el segundo grupo, sin embargo las diferencias no son significativas ($p=0.09$). El AUC_{all} en conejos es alrededor de 60 veces mayor que en vacas y caballos.

Cuadro 1. Parámetros farmacocinéticos obtenidos para los modelos equino, vacuno y leporino.

Parámetro farmacocinético	Modelo equino	Modelo vacuno	Valor de p	Modelo leporino		Valor de p
				Sin anti IgG	Con anti IgG	
AUC _{all} ($\mu\text{L} \times \text{mL}^{-1} \times \text{min}$)	33885 \pm 6890	26580 \pm 2251	0.0904	1942638 \pm 256079	1523903 \pm 299005	0.0775
AUC _{∞} ($\mu\text{L} \times \text{mL}^{-1} \times \text{min}$)	59139 \pm 19394	37924 \pm 8078	0.0899	1946580 \pm 256079	1530884 \pm 300805	0.0800
D _m (%)	62 \pm 20	73 \pm 10	0.3632	100 \pm 0	100 \pm 1	1.0000
T _{max} (min)	8 \pm 5	9 \pm 7	0.8239	8 \pm 15	25 \pm 26	0.3006
C _n _{max} ($\mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}$)	25 \pm 14	7 \pm 1	0.0423*	26 \pm 11	10 \pm 1	0.0274*
V _d (L)	24 \pm 18	61 \pm 18	0.0271*	0.006 \pm 0.001	0.011 \pm 0.002	0.0042*
t _{1/2} (min)	3907 \pm 2834	11294 \pm 3891	0.0220*	2838 \pm 304	3960 \pm 349	0.0029*
K _{el} (min ⁻¹)	0,00018 \pm 0,00011	0,00007 \pm 0,00002	0.0967	0.00025 \pm 0.000025	0.00018 \pm 0.000015	0.0030*
Cl (L \times min ⁻¹)	0,0031 \pm 0,0008	0,0038 \pm 0,0003	0.1524	0.0000016 \pm 0.0000002	0.0000020 \pm 0.0000004	0.1238

Anti-IgGeq: inmunoglobulinas anti-IgG equina; C_n_{max}: concentración máxima; T_{max}: tiempo máximo; AUC_{all}: área bajo la curva de los puntos muestreados; AUC _{∞} : área bajo la curva extrapolado al infinito; D_m: porcentaje de la dosis muestreada; V_d: volumen de distribución observado; K_{el}: constante de eliminación; t_{1/2}: vida media de eliminación; Cl: aclaramiento.

*Las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En los dos modelos leporinos los valores de AUC_{all} y el AUC _{∞} son muy similares, por lo que en ambos el porcentaje de recuperación de la dosis muestreada (D_m) fue de su totalidad (100.0 \pm 0% y 100 \pm 1%). Por su parte, el D_m de vacas y caballos fue de 62 \pm 20% y 73 \pm 10%, respectivamente, en estos casos se logró recuperar cerca de dos terceras partes del antiveneno administrado.

La concentración máxima ($C_{n_{max}}$) obtenida en caballos ($25 \pm 14 \mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}$) fue significativamente superior a la del modelo vacuno ($7 \pm 1 \mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}$). Adicionalmente, en modelo leporino se observaron diferencias significativas entre la $C_{n_{max}}$ del grupo sin anti-IgGeq y la del grupo con el anti-IgGeq ($26 \pm 11 \mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}$ vs. $9.93 \pm 0.66 \mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}$).

El tiempo máximo (T_{max}) entre vacas y caballos fue similar entre sí ($p=0.82$). Por su parte, en conejos, a pesar de que el T_{max} fue 3 veces mayor en aquellos que recibieron anti-IgGeq que en aquellos a los que solo se les administró antiveneno, no se encontraron diferencias significativas entre los promedios ($p=0.30$).

Con respecto al volumen de distribución (V_d), se observó que en el caso de los conejos fue mayor en el grupo que recibió anti-IgGeq que en aquel al que no se le administraron ($0.011 \pm 0.002 \text{ L}$ vs. $0.006 \pm 0.001 \text{ L}$, respectivamente. $p=0.0042$). A su vez, el V_d del modelo vacuno fue tres veces mayor al obtenido en el modelo equino ($61 \pm 18 \text{ L}$ vs. $24 \pm 18 \text{ L}$, $p=0.0271$).

La constante de eliminación (k_{el}) en caballos fue de $0.00018 \pm 0.00011 \text{ min}^{-1}$. De acuerdo al valor anterior, aproximadamente 1.08% del antiveneno es eliminado por hora, es decir, tomaría alrededor de 4 días para que el antiveneno sea eliminado en su totalidad. La k_{el} promedio en vacas fue la mitad de la k_{el} promedio de caballos, por lo que el tiempo estimado de eliminación en vacas sería de 10 días. No obstante, la variabilidad en las k_{el} de cada grupo animal provocó que los promedios no fueran significativamente diferentes ($p=0.097$).

En el caso de los conejos, la k_{el} fue mayor en el grupo al que se le administró anti-IgGeq. La variabilidad dentro del grupo fue menor por lo que las diferencias obtenidas fueron significativas ($p=0.003$). Por lo tanto, se observó que los animales que no recibieron anti-IgGeq tardan 3 días en eliminar el antiveneno a diferencia de los que sí recibieron el anti-IgGeq que tardan aproximadamente 4 días.

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) en conejos mostró que aquellos que recibieron pasivamente anti-IgGeq duran más tiempo en eliminar el antiveneno ($3960 \pm 349 \text{ min}$), en comparación al grupo sin anti-IgGeq ($2838 \pm 304 \text{ min}$)($p=0.0029$). Así mismo, en caballos se tarda $3907 \pm 2834 \text{ min}$ para disminuir a la mitad la concentración de anticuerpos y en vacas se dura 3 veces más ($11294 \pm 3891 \text{ min}$).

Por último, el aclaramiento fue muy similar entre caballos y vacas ($p=0.15$), y entre los dos grupos de conejos ($p=0.12$). El aclaramiento fue 1000 veces mayor en vacas y caballos al compararlo con los conejos.

7. DISCUSIÓN

Los antivenenos ofídicos han sido la única herramienta eficaz y científicamente probada que logra mitigar los efectos de un envenenamiento producido por la mordedura de una serpiente (WHO, 2010). Sin embargo, para que los antivenenos puedan ejercer su efecto terapéutico, estos deben administrarse lo más pronto posible, en la dosis adecuada según sea requerido por la severidad del envenenamiento (Gutiérrez *et al.*, 2003).

La farmacocinética es el estudio de las concentraciones de los fármacos (y sus metabolitos) en los líquidos biológicos, tejidos y excretas, así como su relación con la respuesta farmacológica (Mehvar, 2001). Las concentraciones plasmáticas y tisulares de los fármacos no son estáticas, más bien cambian con el tiempo de acuerdo a los equilibrios establecidos entre tres procesos que ocurren simultáneamente luego de la administración del medicamento: i) absorción, proceso mediante el cual un fármaco atraviesa una serie de membranas y barreras para llegar desde su punto de administración hasta la sangre, ii) distribución, proceso en el que el fármaco se distribuye desde la sangre hasta los tejidos donde ejerce su acción farmacológica, y iii) eliminación, proceso mediante el cual un fármaco es metabolizado y/o excretado del organismo.

Debido a la dificultad que supone la medición de los fármacos en su sitio de acción y a que en muchos casos las concentraciones de los fármacos en los tejidos dependen de su concentración en sangre, los estudios de farmacocinética clásica emplean las concentraciones plasmáticas del fármaco para estimar su concentración en tejidos. Empleando esta metodología, se han realizado comparaciones entre antivenenos constituidos por moléculas IgG (150 kDa), F(ab')₂(100 kDa) y Fab (50 kDa). De estas comparaciones se ha concluido que entre más pequeña la molécula empleada como principio activo, esta se distribuye más rápidamente en un volumen más grande, que abarca compartimentos tisulares más profundos (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Con base en lo anterior, varios estudios han supuesto que los antivenenos constituidos por fragmentos son más eficaces neutralizando los efectos tóxicos de los venenos de serpiente, que los antivenenos constituidos por moléculas de IgG completa. Sin embargo, la evidencia experimental recopilada de estudios de neutralización en modelos animales no ha apoyado esta presunción (Gutiérrez *et al.*, 1998).

Esta discrepancia entre teoría y práctica podría deberse a la acción de un mecanismo de reconocimiento de los anticuerpos equinos como extraños en el animal empleado como modelo. De ser este el caso, la disminución inicial en la concentración plasmática del antiveneno no correspondería a la fase de distribución del antiveneno (como se plantea en la farmacocinética clásica), sino a una fase de eliminación temprana de los anticuerpos equinos, producida por el carácter heterólogo de los mismos.

7.1 EFECTO DE LA ALTERIDAD DE LOS ANTICUERPOS EQUINOS SOBRE LA ABSORCIÓN DEL ANTIVENENO.

Durante la absorción, los medicamentos sufren un proceso de eliminación pre-sistémica cuya magnitud depende de la vía de administración. Por ejemplo, cuando un antiveneno es administrado por la vía intramuscular, los anticuerpos equinos deben atravesar diferentes barreras físicas para llegar a la sangre. Durante este trayecto, algunos de los anticuerpos son fijados a tejidos, metabolizados y eliminados. En consecuencia, solo una fracción de los anticuerpos administrados llega a sangre. En contraste, cuando el antiveneno es administrado por la vía intravenosa, todos los anticuerpos administrados son absorbidos instantáneamente (Rovira *et al.*, 1992; Gutiérrez *et al.*, 2003).

En todos los experimentos realizados en este estudio el antiveneno fue administrado por la vía intravenosa. Sin embargo, el Figura 2 muestra en el modelo equino la presencia de un pico en la concentración plasmática del antiveneno, similar al observado durante el proceso de absorción que sufren los fármacos administrados por vía oral, intramuscular o subcutánea. Esto debido al aumento en la concentración plasmática del antiveneno en los primeros tiempos de muestreo (Pépin-Covatta *et al.*, 1996).

En los modelos vacuno y equino, animales de aproximadamente 300 kg, recibieron 100 mL de antiveneno. Esta dosis (0.3 mL/kg) corresponde con lo administrado a estas especies para el tratamiento de envenenamientos leves. Debido a que el antiveneno fue administrado empleando la vía intravenosa, la farmacocinética clásica asume que la cantidad de anticuerpos equinos absorbidos, es igual a la cantidad de anticuerpos equinos administrados (Smith *et al.*, 2001). La cantidad de anticuerpos equinos absorbidos y biodisponibles es calculada como la integración del área bajo curva (AUC) obtenida al graficar la concentración de antiveneno en función del tiempo (Smith *et al.*, 2001).

Como muestra el Cuadro 1, el valor de AUC_{all} y el AUC_{∞} obtenido en caballos fue ligeramente mayor al obtenido en vacas, a pesar de que las diferencias no fuesen significativas. Debido a que en ambos modelos se administró la misma cantidad de antiveneno, nuestros resultados se ajustan a lo supuesto por la farmacocinética clásica. El antiveneno de origen equino presenta la misma biodisponibilidad independiente a la especie a la que se administre el mismo (Khan *et al.*, 2000). Lo anterior se confirma con los dos grupos de conejos empleados en el experimento. Las AUC_{all} y el AUC_{∞} indican que los anticuerpos anti-IgGeq no afectan la biodisponibilidad del antiveneno.

Por otra parte, considerando que: i) el peso promedio de los caballos fue de aproximadamente 300 kg; ii) el volumen sanguíneo de un caballo sano corresponde a 72 mL/kg (Feldman *et al.*, 2000); iii) que un caballo sano presenta un hematocrito promedio de 40% (Marcilese *et al.*, 1964), se estimó que el volumen plasmático de estos animales es de aproximadamente 12 L. Además, siendo 100 mL la dosis de antiveneno administrada a cada animal, la Cn_{max} esperada para este modelo se estimó en aproximadamente 8 μ L de antiveneno/mL de plasma. Sin embargo, el resultado obtenido experimentalmente fue más del 300% de esa concentración estimada. Este fenómeno se explica por el retardo en la homogenización del antiveneno en el plasma producto del bajo gasto cardíaco en caballos con respecto a vacas y conejos (Fisher *et al.*, 1959; Cumming *et al.*, 1962).

De modo similar, la Cn_{max} esperada para el modelo vacuno se estimó en aproximadamente 8 μ L de antiveneno/mL de plasma. Los resultados obtenidos experimentalmente se ajustaron a esa concentración. Tanto en el modelo equino como vacuno, el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima (T_{max}) fue similar (Cuadro 1).

La diferencia observada en la Cn_{max} de los modelos equino y vacuno pudo ser reproducida en conejos. En caballos, la Cn_{max} fue mayor que en vacas, y en conejos sin anti-IgGeq la Cn_{max} fue mayor que en los que la recibieron. Por lo tanto, la Cn_{max} disminuye significativamente con la presencia de anti-IgGeq en sangre (Gráfico 2).

Por otra parte, considerando que: i) el peso promedio de los conejos fue de aproximadamente 3 kg; ii) el volumen sanguíneo de un conejo sano corresponde a 54 mL/kg (Little, 1970); y iii) que un conejo sano presenta un hematocrito promedio de 40%, se estimó que el volumen plasmático de estos animales es de aproximadamente 0.1 L. Además, siendo la

dosis de antiveneno administrada a cada animal de 1mL/kg, la $C_{n_{max}}$ esperada fue de aproximadamente 30 μ L de antiveneno/mL de plasma. Para el modelo libre de anti-IgGeq se obtuvo un 86% de la concentración esperada. No obstante, los conejos que recibieron anti-IgGeq alcanzaron solamente 33% de la concentración máxima estimada. De acuerdo a los datos obtenidos, se puede decir que los anti-IgGeq logran modificar sustancialmente la $C_{n_{max}}$ del antiveneno.

Cabe destacarse que el AUC_{all} en conejos es 57 y 73 veces más elevado que en caballos y vacas, respectivamente. Este hecho puede explicarse por la dosis de antiveneno aplicada en las diferentes especies. En conejos, la dosis fue de 1 mL/kg, mientras que en vacas y caballos fue de 0.3 mL/kg. Esto lleva a que en el primer modelo, existan más anticuerpos circulantes con respecto al peso (Smith *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en el modelo de conejo sugieren que una fracción de la dosis administrada pudo haber sido eliminada por algún mecanismo inmunológico. Extrapolando lo obtenido en conejos a lo que sucede en vacas, una posibilidad es que ocurra la formación de complejos entre los anticuerpos equinos con anticuerpos vacunos heterofílicos anti-IgGeq presentes en el plasma vacuno, tal como se ha descrito en seres humanos (Skalba *et al.*, 1969; Herrera *et al.*, 2005; Sevcik *et al.*, 2008). La remoción de estos inmunocomplejos podría estar mediada por los receptores para Fc presentes en macrófagos de hígado y bazo (Hnatowich *et al.*, 1990; Kindt *et al.*, 2007), así como sucede durante el secuestro de los inmunocomplejos formados por auto-anticuerpos plaquetarios (Teeling *et al.*, 2003).

7.2 EFECTO DE LA ALTERIDAD DE LOS ANTICUERPOS EQUINOS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL ANTIVENENO.

Una vez en sangre, las IgG equinas se distribuyen teóricamente de acuerdo con un modelo bicompartimental (Quesada *et al.*, 2006). En este modelo, los anticuerpos equinos pasan del compartimento central constituido por el agua plasmática, el agua intersticial y el agua intracelular de tejidos muy irrigados como el corazón, el riñón, los pulmones o el hígado, a un compartimento tisular superficial constituido por el agua intracelular de tejidos menos accesibles como piel, músculo y grasa (Gutiérrez *et al.*, 2003). Algunos estudios indican que los anticuerpos equinos pueden acceder a un tercer compartimento llamado "tisular

profundo”, el cual está constituido por tejidos a los que los anticuerpos equinos se unen más fuertemente y de los que por tanto, se liberan con mayor lentitud (Ismail *et al.*, 1998).

En nuestro estudio, los datos se trabajaron de acuerdo a un modelo no compartimental debido a que: i) no limita el tratamiento de los datos hacia una función matemática en específico; ii) los anticuerpos no siempre se adecúan a un modelo en particular debido a la variabilidad intrínseca de los sistemas biológicos a los que se aplican. No obstante, las curvas farmacocinéticas de las tres especies estudiadas se ajustaron a una curva monoexponencial, similar a la que ocurre en un modelo monocompartimental (Shargell *et al.*, 1999).

El volumen de distribución (V_d) es el volumen en el cual un fármaco se distribuye. Es un número teórico que asume que la droga está en igual concentración en el tejido y en la circulación, y representa qué volumen (o masa) de tejido es requerido para arrojar ese dato (Smith *et al.*, 2001; Holford, 2007). Teóricamente, podría calcularse dividiendo la dosis entre el AUC_{all} y la k_{el} . Debido a que los fármacos no solo se disuelven en el agua corporal, sino que también pueden estar asociados a proteínas plasmáticas y a algunos tejidos, el V_d no es un volumen real, sino un volumen aparente que relaciona la concentración plasmática con la cantidad total de fármaco que hay en el organismo en un determinado momento (Burton *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2001).

El modelo vacuno se utilizó como modelo de la influencia inmunológica de los anticuerpos administrados, mientras que los caballos se emplearon como blanco de estudio. En ambas especies, las condiciones experimentales fueron las mismas: lote de antiveneno, dosis de antiveneno por kg de peso, vía de administración, sitio de aplicación del antiveneno, tiempos de muestreo similares e igual método de detección. Si la extravasación es el mecanismo preponderante que explica la caída de la concentración plasmática del antiveneno, en caballos y vacas debería obtenerse un V_d similar.

Al comparar los valores de V_d calculados para los modelos equino y vacuno, observamos que en las vacas, este volumen es significativamente mayor que en los caballos. Este resultado podría ser interpretado como que los anticuerpos equinos se distribuyen en un volumen mayor cuando son administrados a vacas, que cuando son administrados a caballos. De acuerdo a lo anterior, podría especularse que los antivenenos de origen equino podrían ser

más eficaces neutralizando los efectos tóxicos producidos por el veneno en vacas, que en caballos (Covell *et al.*, 1986).

Alternativamente, esta diferencia observada entre los modelos equino y vacuno podría ser explicada por el planteamiento matemático para obtener el V_d . Al dividir la dosis administrada entre un AUC_{all} menor, se obtiene un valor de V_d que da la impresión de que el antiveneno se distribuyó en un volumen mayor del que podría ser en realidad (Smith *et al.*, 2001).

Este mismo efecto en el valor de V_d se repitió en el modelo leporino empleando anti-IgGeq. En este caso, los conejos que recibieron anti-IgGeq mostraron una AUC_{all} más baja que los animales del grupo control y por lo tanto los valores calculados para el V_d resultaron más altos. En este caso, podemos afirmar que el resultado fue artificialmente afectado por los anticuerpos anti-IgGeq, ya que en todos los conejos, el volumen en el cual se puede distribuir el antiveneno debe ser el mismo.

Idealmente, los anticuerpos equinos deberían distribuirse en los tejidos donde se supone que ejercerán su efecto farmacológico. Por lo tanto, los anticuerpos neutralizantes de las toxinas que producen efectos sistémicos deberían distribuirse en el espacio intravascular. Mientras, los anticuerpos neutralizantes de las toxinas que producen efectos locales deberían distribuirse en el tejido donde el veneno fue inyectado. En este sentido, el paso de los anticuerpos equinos a tejido se ve influenciado por la inflamación producida por el veneno. La vasodilatación y el aumento en la permeabilidad capilar favorecen la extravasación de los anticuerpos del antiveneno en el sitio exacto donde el veneno fue inyectado (León *et al.*, 2001).

De manera interesante, en el modelo equino se observó un ligero aumento en la concentración plasmática de antiveneno alrededor de un día después de haberse administrado el bolo intravenoso. Este fenómeno no se reprodujo en modelo leporino ni vacuno. Dicho aumento podría deberse a la recirculación de los anticuerpos producto de la interacción con el receptor Brambell o FcRn específico de especie (Junghans *et al.*, 1996).

7.3 EFECTO DE LA ALTERIDAD DE LOS ANTICUERPOS EQUINOS SOBRE LA ELIMINACIÓN DEL ANTIVENENO.

La concentración de un fármaco en un organismo disminuye como consecuencia de dos mecanismos: i) metabolismo y ii) excreción. En el caso de los antivenenos constituidos por IgG completa o fragmentos $F(ab')_2$, la eliminación ocurre principalmente en hígado. Por otra parte, para los antivenenos constituidos por fragmentos Fab este proceso ocurre principalmente por excreción vía urinaria (Covell *et al.*, 1986).

La farmacocinética de los antivenenos tradicionalmente se ha descrito en situaciones de envenenamiento. Se ha observado que el daño en la arquitectura vascular producido por las toxinas del veneno conlleva a la extravasación de las inmunoglobulinas hacia el intersticio (Battellino *et al.*, 2004, Quesada *et al.*, 2006).

En una situación de no envenenamiento, los anticuerpos disminuyen rápidamente en sangre y en poco tiempo pueden encontrarse en tejido muscular (Rovira *et al.*, 1992). No obstante, deben existir procesos alternativos a las rutas paracelulares o endocítica de endotelio (Lobo *et al.*, 2004), para explicar la caída abrupta en la concentración plasmática de los anticuerpos.

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) es un parámetro que se emplea para caracterizar el proceso de eliminación de un fármaco. Este es definido como el tiempo que tarda un fármaco en alcanzar la mitad de su $C_{n_{max}}$ (Holford, 2007). La constante de eliminación (K_{el}), indica la proporción del fármaco que es eliminado por unidad de tiempo (Smith *et al.*, 2001). Entre más grande sea la K_{el} , más rápidamente será la eliminación del fármaco y su vida media de eliminación será más pequeña.

Dado que el descenso en las concentraciones plasmáticas de antiveneno es exponencial, se considera que su cinética de eliminación es de orden 1 (Lobo *et al.*, 2001). Entonces, al graficar en un sistema semilogarítmico la concentración de fármaco en función del tiempo, se obtiene una línea recta cuya pendiente es igual a la K_{el} . De este modo, entre mayor es la $C_{n_{max}}$, mayor es la pendiente de la recta y mayor es la velocidad de eliminación del fármaco (Smith *et al.*, 2001).

La k_{el} fue mayor en el modelo equino que en el vacuno, aunque las diferencias no fueron significativas. La tasa de eliminación del antiveneno equino es mayor en caballos que en vacas, durando alrededor de 4 días para removerlo en su totalidad del cuerpo para el

primer grupo y cerca de 10 días en el segundo. En conejos, la k_{el} tuvo un comportamiento similar que en vacas y caballos. Las anti-IgGeq alteran la eliminación del antiveneno equino, provocando mayor permanencia del mismo en sangre.

Por otro lado, la $t_{1/2}$ fue menor en caballos que en vacas, así como en conejos tratados con anti-IgGeq que en los que no. Se debe tener en cuenta que: i) la k_{el} fue mayor en caballos que en vacas, aunque no de manera significativa; ii) la diferencia se magnifica cuando se toma en cuenta que el parámetro proviene del cociente entre el $\ln(2)$ y la k_{el} . Al ser la $t_{1/2}$ menor en caballos que en vacas, indica que los anticuerpos equinos en el modelo homólogo, tardan menos tiempo en ser eliminados que en un modelo heterólogo. La afirmación anterior fue confirmada por los resultados obtenidos en conejos. La formación de complejos inmunes entre los anti-IgGeq y el antiveneno parece retardar la eliminación de sangre.

Este resultado es discordante con lo esperado para un anticuerpo administrado a su modelo homólogo (Israel *et al.*, 1996; Bichler *et al.*, 2003; Kuitwaard *et al.*, 2009). Sin embargo, otros factores como las interacciones que pueden establecerse en receptores FcRn y las inmunoglobulinas que constituyen el antiveneno (Ober *et al.*, 2001) podrían explicar estos resultados.

Los FcRn o receptor Brambell son expresados en diversas células. Las IgG ingresan a la célula por pinocitosis a una vacuola endocítica, donde a pH ligeramente ácido (5.5-6) se unen en su porción Fc al FcRn y luego son devueltas a circulación por exocitosis. Este mecanismo ha explicado la larga vida media de las IgG con respecto a otras proteínas plasmáticas (Junghans *et al.*, 1996).

De modo similar, dichos receptores de Fc pueden funcionar al facilitar la endocitosis mediada por receptor hacia el intersticio (McCarthy *et al.*, 2000). Por otra parte, las IgG que no se unen al FcRn del endosoma son degradadas por enzimas contenidas en los lisosomas, lo que explica la baja vida media de inmunoglobulinas heterólogas (Junghans *et al.*, 1996).

Comparando los resultados obtenidos en caballos, un modelo similar al de nuestro experimento es la administración de inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) en seres humanos. La $t_{1/2}$ de las IVIG es de 24 a 36 días según el régimen de dosificación (Weisman *et al.*, 1989, Wasserman *et al.*, 2009). En contraste, nuestros resultados indican que la vida media de los anticuerpos equinos en un modelo de caballo es de aproximadamente 3 días. Esta diferencia podría explicarse por: i) en seres humanos normalmente se aplica una dosis de 1-3 g/kg de

IVIG (Vani *et al.*, 2008), en nuestro experimento se aplicó una dosis entre 50 y 150 veces menor (0.02 g/kg de antiveneno); ii) la administración de las IVIG es por medio de infusión intravenosa (Vani *et al.*, 2008), mientras que la administración del antiveneno fue en bolo.

Por último, la tasa de aclaramiento (Cl) se define como la cantidad de fármaco que se aclara de sangre por unidad de tiempo (Smith *et al.*, 2001). Este parámetro depende del V_d así como de la proporción del compuesto que se elimina por hora. Teniendo en cuenta estas dos variables, el valor del aclaramiento resulta similar para caballos y vacas, así como en conejos con anti-IgGeq y sin anti-IgGeq. Este fenómeno puede explicarse por: i) el V_d fue un parámetro que se manipuló en conejos, demostrando que los anti-IgGeq matemáticamente pueden alterar su valor; ii) los conejos con anti-IgGeq mostraron mayor V_d así como las vacas tuvieron un V_d tres veces mayor que los caballos; iii) la k_{el} en promedio fue mayor en caballos, por lo que, iv) el Cl resulta igual en caballos y vacas.

Un experimento efectuado en conejos con la misma dosis que nuestro trabajo, arrojó resultados menores con respecto al AUC_{∞} , la $t_{1/2}$ y el Cl, a pesar de que las curvas a grandes rasgos fuesen similares (Quesada *et al.*, 2006). Las diferencias pueden explicarse por: i) el antiveneno empleado por Quesada *et al.*, fue monoespecífico anti-*Micrurus nigrocinctus*; ii) la concentración de proteínas del antiveneno empleado en su trabajo fue de 1.58 g/dL, 3 veces menor a la empleada en nuestro experimento. Lo anterior conduce a que la eliminación es más rápida y la biodisponibilidad es menor en el trabajo de Quesada *et al.*, por la menor cantidad de inmunoglobulinas administradas (Smith *et al.*, 2001).

7.4 EFECTO DE LA ESPECIE SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE ANTICUERPOS HETERÓLOGOS.

En este estudio la farmacocinética de los anticuerpos equinos fue estudiada empleando dos modelos heterólogos: vacas y conejos. Diferentes estudios han encontrado que los parámetros farmacocinéticos calculados para los mismos productos difieren según el animal que sea empleado como modelo (Bazin-Redureau *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2006).

Otro factor adicional que contribuye a marcar las diferencias entre los datos obtenidos de los modelos vacuno y leporino es que mientras en conejos la dosis administrada fue de 1.0 mL/kg de peso, en vacas la dosis fue de 0.3 mL/kg. Esto lleva a que en el primer modelo,

existan mayor concentración de anticuerpos circulantes, y por lo tanto algunos parámetros como el AUC_{all} y AUC_{∞} sean mayores (Smith et al., 2001).

Un efecto importante sobre la farmacocinética del antiveneno, es la afinidad de las inmunoglobulinas heterólogas del antiveneno hacia el FcRn del modelo animal empleado. A pesar de que no se comprobó en el laboratorio, se ha observado que algunas especies unen con mayor o menor afinidad la porción Fc de IgG heterólogas (Ober *et al.*, 2001), lo que puede llevar a explicar la diferencia entre especies en la recirculación y/o eliminación del antiveneno heterólogo.

Los anticuerpos heterofílicos son inmunoglobulinas producidas contra anticuerpos de una especie animal definida. Estos se forman principalmente posterior la administración de inmunoglobulinas para el tratamiento de alguna enfermedad o suceso patológico. Por su parte, los anticuerpos heterófilos son multiespecíficos al producirse por una activación policlonal de los linfocitos (Kaplan *et al.*, 1999). Se han encontrado anticuerpos anti-IgG equina y ovina en pools de plasma de donadores sanos en Costa Rica (Herrera *et al.*, 2005), y en otras investigaciones, anti-IgY de gallina, IgG bovina y en menor medida anti-IgG equina (Sevcik *et al.*, 2008).

La producción de anticuerpos anti-especie puede ocurrir por alguno de los siguientes mecanismos: i) inmunización intestinal, como ocurre en una alergia alimentaria (Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1991); ii) exposición al cabello o piel descamada de los animales principalmente en individuos en constante contacto con los mismos (Hunter *et al.*, 1980); iii) existencia natural de anticuerpos anti-IgG de otra especie; y iv) combinación de cualquier de los 3 mecanismos anteriores.

La presencia de anticuerpos heterofílicos, independiente de su mecanismo de formación, conlleva al acomplejamiento de las inmunoglobulinas administradas pasivamente. En conejos, se pudo observar que las anti-IgGeq afectan el comportamiento farmacocinético del antiveneno al producir de manera aparente, una eliminación más lenta del mismo. Las anti-IgGeq pudieron haber estado presentes en vacas para explicar la alteridad del antiveneno y por lo tanto, de su similitud con el modelo en conejos.

8. CONCLUSIONES

Existen diferencias en los comportamientos farmacocinéticos de los antivenenos ofídicos entre modelos homólogos y heterólogos al origen de los anticuerpos. El modelo vacuno se comportó similar a los conejos con anti-IgG equina y el modelo equino fue semejante al modelo leporino control. Puede especularse que los anti-IgGeq están presentes en vacas para explicar la similitud con los conejos que recibieron éstas inmunoglobulinas.

La farmacocinética del antiveneno se modifica al existir anticuerpos heterofílicos en sangre. Los anti-IgGeq provocan que muchos parámetros farmacocinéticos entre ellos la biodisponibilidad expresada como el AUC_{all} , disminuya aunque no de manera significativa en conejos con anti-IgGeq con respecto a controles. Si se compara la biodisponibilidad entre caballos y vacas, la misma no varía considerablemente.

Por su parte, el V_d es el parámetro que ayuda a dilucidar que la disminución en la concentración plasmática del antiveneno no se da exclusivamente por la extravasación y distribución a compartimentos tisulares. Los resultados de éste parámetro demostraron que el antiveneno puede tener cierto grado de alteridad en modelos heterólogos que llevan a obtener los valores que se han expuesto en la farmacocinética clásica.

Los parámetros de eliminación indican que los anticuerpos se eliminan más lento en modelos homólogos que en los heterólogos, contrario a lo esperado. El Cl , la $t_{1/2}$ y la k_{el} , indicaron que el antiveneno se elimina más rápido en caballos que en vacas, y más rápido en los conejos controles que los que recibieron anti-IgGeq. Para entender mejor este fenómeno se requieren de más estudios tomando en cuenta los FcRn involucrados en la recirculación de los anticuerpos.

La alteridad del antiveneno de origen equino es una característica intrínseca de los anticuerpos cuando se aplican a especies animales heterólogas. No obstante, esta característica de cuerpo extraño no le confiere mayor grado de eliminación tal como se planteó en la hipótesis del trabajo. La alteridad de los anticuerpos modifican su perfil farmacocinético en cuanto a la distribución, mas no en la eliminación.

9. RECOMENDACIONES

Como futuras estrategias para ampliar el conocimiento en esta área se propone: i) estudiar el efecto de los inmunocomplejos formados con anticuerpos en el aclaramiento, vida media terminal y tiempo medio de residencia en modelos heterólogos; ii) emplear antiveneno marcado con radioactividad en conejos para determinar su distribución en los diferentes compartimentos; iii) determinar el título de anti-IgGeq que se produce posterior a la administración de un antiveneno heterólogo; iv) determinar el papel del hígado y bazo como aclaradores de antiveneno; v) estudiar la afinidad del FcRn de diferentes modelos animales sobre inmunoglobulinas equinas; vi) analizar el comportamiento del antiveneno compuesto de anticuerpos producidos en llama o camellos; vii) estudiar la farmacocinética de antiveneno compuesto de anticuerpos quiméricos; viii) estudiar la farmacocinética del antiveneno a diferentes formulaciones de proteínas totales; ix) estudiar la farmacocinética del antiveneno a diferentes dosis iniciales.

10. REFERENCIAS

- Alape, A., Persson, B., Cederlund, E., Flores-Díaz, M., Gutiérrez, J.M., Thelestam, M., Bergman, T. & Jornvall, H. (1999). Elapid venom toxins: multiple recruitment of ancient scaffolds. *Eur J Biochem.* 259(1-2):225-234.
- Badilla, B., Chaves, F., Mora, G. & Poveda, L. (2004). Edema induced by *Bothrops asper* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plant extracts. *Rev Biol Trop.* 54(2): 245-252.
- Barraviera, B. (1995). Editor's Point of View. *J Ven Anim Toxins.* 1(1): 5-6.
- Battellino, C., Piazza, R., da Silva, A., Cury, Y & Farsky, S.H. (2003). Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon.* 41(5):583-593.
- Bazin-Redureau, M., Pépin, S., Hong, G., Debrava, M. & Scherrmann, J.M. (1998). Interspecies scaling of clearance and volume of distribution for horse antivenom F(ab')₂. *Toxicol Appl Pharmacol.* 150(2): 295-300.
- Bernhisel-Broadbent, J., Yolken, R. & Sampson, H. (1991). Allergenicity of orally administered immunoglobulin preparations in food-allergic children. *Pediatrics.* 87(2):208-214.
- Bichler, J., Schondorfer, G., Pabst, G. & Andresen, I. (2003). Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. *BJOD.* 110: 39-45.
- Borkow, G., Gutiérrez, J.M. & Ovadia, M. (1995). In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon.* 33(10):1387-1391.
- Bucarechi, F., Hyslop, S., Vieira, R., Toledo, A., Madureira, P. & De Capitani, E. (2006). Bites by coral snakes (*Micrurus* sp.) in Campinas, State of Sao Paulo, southeastern Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 48(3):141-145.
- Burnouf, T., Griffiths, E., Padilla, A., Seddick, S., Stephano, M.C. & Gutiérrez, J.M. (2004). Assesment of viral safety of antivenoms fractioned from equine plasma. *Biologicals.* 32:115-128.

Burton, M., Shaw, L., Schentag, J. & Evans, W. (2006). Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring. Lippincott Williams & Wilkins. 4ta edición. p81-90

Cháves, F., Barboza, M. & Gutiérrez, J.M. (1995). Pharmacological study of edema induced by the venom of *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon*. 33(1): 31-39.

Chugh, K., Aikat, B., Sharma, B., Dash, S., Thomas M. & Das, C. (1975). Acute Renal Failure following snakebite. *Am J Trop Med Hyg*. 24(4):692-697.

Clark, M. (2000). Antibody humanization: a case of the "Emperor's new clothes"? *Immunology Today*. 8:397-402.

Covell, D., Barbet, J., Holton, O., Black, C., Parker, R. & Weinstein, J. (1986). Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G₁, F(ab')₂ and Fab' in mice. *Cancer Res*. 46: 3969-3978.

Cumming, J. & Nutt, M. (1962). Bone-marrow blood flow and cardiac output in the rabbit. *J Physiol*. 162:30-34.

Dart, R., Seifert, S., Boyer, L., Clark, R., Hall, E., McKinney, P., McNally, J., Kitchens, C., Curry, S., Bogdan, G., Ward, S. & Porter, S. (2001). A randomized multicenter trial of Crotalinae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom for the treatment for Crotalinae snakebite in United States. *Arch Inter Med*. 161: 2030-2036.

Dhillon, S. & Gill, K. (2006). Basic pharmacokinetics. Pharmaceutical Press. Primera edición.

Feldman, B., Zinkl, J. & Jaim, N. (2000). Schalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing. Quinta edición. p852.

Fernández, P. & Gutiérrez, J.M. (2006). Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon*. 52(3):530-533.

Fernández, S. 2007. El envenenamiento ofídico en animales domésticos de Costa Rica. Aspectos clínicos y epidemiológicos. Tesis licenciatura en medicina veterinaria, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 38 p.

Fernández, P. & Gutiérrez, J.M. (2008). Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon*. 52:530-533.

Ferreira, J. & Barraviera, B. (2004). Management of Venomous Snakebites in Dogs and Cats in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 10(2): 112-132.

Fisher, E. & Dalton, R. (1959). Cardiac output in horses. *Nature.* 184:2020-2021.

Flanagan, R. & Jones, A. (2004). Fab antibody fragments some applications in clinical toxicology. *Drug Safety.* 27(14): 1115-1133.

Gao, W., Johnston, J., Miller, D. & Dalton, J. (2006). Interspecies differences in pharmacokinetics and metabolism of S-3-(4-acetyl-amino-phenoxy)2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide: the role of N-acetyltransferase- Drug Metabolism and Disposition. 34(2):254-260.

García, M., Monge, M., León, G., Lizano, S., Segura, E., Solano, M., Rojas, G. & Gutiérrez, J.M. (2002). Effect of Preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity on horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. *Biologicals.* 30(2): 143-151.

Goularte, F., da Cruz-Hofling, M., Corrado, A. & Rodrigues-Simioni, L. (1999). Electrophysiological and ultrastructural analysis of the neuromuscular blockade and miotoxicity induced by *Micrurus nigrocinctus* snake venom. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 49(4):290-296.

Grundmann, K. 2001. Emil von Behring: the founder of serum therapy. (Descargado el 22 de febrero del 2009 en http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/articles/behring/index.html).

Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Chaves, F., Lomonte, B. & Cerdas, L. (1986). Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. *Br J Exp Pathol.* 67(1): 1-12.

Gutiérrez J.M. & Lomonte, B. (1995). Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon.* 33(11):1405-1424

Gutiérrez, J.M. & Rojas, G. (1999). Instituto Clodomiro Picado: Ciencia y tecnología endógenas en la solución de salud pública en Centroamérica. *Interciencia.* 24(3):182-186.

Gutiérrez, J.M., León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A. & Chaves, F. (1998). Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (tercipelo) snake venom. *Toxicon*. 36(11): 1529-1538.

Gutiérrez, J.M. & Ownby, C. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 42(8): 915-931.

Gutiérrez, J.M., León, G. & Lomonte, B. (2003). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinetic*. 42(8): 721-741.

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.

Gutiérrez, J.M., Theakston, D. & Warrell, D. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *Plos Medicine*. 3(6):727:731.

Gutiérrez, J.M., Gondo Higashi, H., Hui Wen, F. & Burnout, T. (2007). Strengthening antivenom production in Central and Southamerican public laboratories: report of a workshop. *Toxicon*. 49(1):30-35.

Guyer, C. & Donnelly, M. (2004). *Amphibians and reptiles of La Selva, Costa Rica and the Caribbean Slope: A Comprehensive Guide*. University of California Press. Primera edición.

Hawgood, B. (1999). Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon*. 37(9): 1241-1258.

Herrera, M., León, G., Segura, A., Meneses, F., Lomonte, B., Chippaux, J. & Gutiérrez, J.M. (2005). Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon*. 46:775-781.

Hnatowich, D., Rusckowki, M. & Brill, A. (1990). Pharmacokinetics in patients of an anti-carcinoembryonic antigen antibody radiolabeled with Indium-111 using a novel diethylenetriamine pentaacetic acid chelator. *Cancer Res*. 50:7272-7278.

Holford, N. (2007). *Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: rational dosing & the time course of drug action*. Basic and Clinical Pharmacology. 10ma edición. McGraw-Hill Medical.

Hunter, W. & Budd, P. (1980). Circulating antibodies to ovine and bovine immunoglobulin in healthy subjects: A hazard for immunoassays. *Lancet*. 2(8204):1136.

Ismail, M., Aly, H., Abd-Elsalam, M. & Morad, A. (1996). A three-compartment open pharmacokinetic model can explain variable toxicities of cobra venoms and their alpha toxins. *Toxicon*. 34(9): 1011-1026.

Ismail, M. & Abd-Elsalam, A. (1998). Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled IgG, F(ab')₂ and Fab fractions of scorpion and snake antivenins: merits and potential for therapeutic use. *Toxicon*. 36(11): 1523-1528.

Israel, E., Wilsker, D., Hayes, K., Schoenfeld, D. & Simister, N. (1996). Increased clearance of IgG in mice that lack β 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology*. 89: 573-578.

Junghans, R. & Anderson, C. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the B2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Immunology*. 93:5512-5516.

Kaplan, I. & Levinson, S. (1999). When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When is an antibody against a specific immunogen? *Clin Chem*. 45(5):616-618.

Kasturiratne, A., Wickremasinghe, R., de Silva, N., Gunawardena, N., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. & de Silva, H. (2008). The Global Burden of Snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and death. *Plos Medicine*. 5(11): 1591-1604.

Khan, J., Montaseri, J., Poglod, M., Bu, H., Zuo, Z., Salama, S., Daneshtalab, M. & Micetich, R. (2000). Interspecies comparison of pharmacokinetics of the novel triazole antifungal agent SYN-2869 and its derivatives. *Antimicrob Agents and Chemother*. 44(4):910-915.

Kindt, T., Goldsby, R. & Osborne, B. (2007). *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill.

Koscinczuk, P., Borda, J., Marunak, S., Acosta de Perez, O. & Mussart, N. (2004). Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. *Medicina (B. Aires)*. 64(4):320-324.

Kuitwaard, K., De Gelder, J., Tio-Gillen, A., Hop, W., van Gelder, T., van Toorenenbergen, A., Von Doorn, P. & Jacobs, B. (2009). Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin and outcome of Guillain-Barré syndrome. *Annals Neurology*. 66(5):597-603.

Kuus-Reichel, K., Grauer, L., Karavodin, L., Knott, C., Krusemeier, M. & Kay, N. (1994). Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Am Soc Microbiol*. 1(4): 365-372.

León, G., Rojas, G., Lomonte, B & Gutiérrez, J.M. (1997). Immunoglobulin G and F(ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 35:1627-1637.

León, G., Valverde, J.M., Rojas, G., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (2000). Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 38:233-244.

León, G., Valverde, J., Rojas, G., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (2001). Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 38(2): 233-244.

León, G., Monge, M., Rojas, E., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (2001). Comparison between IgG and F(ab')₂ polyvalent antivenoms : neutralization of systemic effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon*. 39(6): 793-801.

León, G., Rodríguez, M., Rucavado, A., Fernandez, I., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (2007). Anti-human erythrocyte antibodies in horse-derived antivenoms used in the treatment of snakebite envenomations. *Biologicals*. 35:5-11.

León, G., Segura, A., Herrera, M., Otero, R., de Siqueira-França, F., Barbaro, K., Cardoso, J., Wen, F., de Medeiros, C., Prado, J., Malaque, C., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (2008). Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: assessment of their role in the early

adverse reactions to antivenom administration. *Toxicon*. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* *102*(11): 1115-1119.

Linton, D. (2005). *Emil Von Behring: Infectious Disease, Immunology, Serum Therapy*. DIANE Publising. 580 pp.

Little, R. (1970). Changes in blood volume of the rabbit with age. *J Physiol.* *208*:485-497.

Lobo, E., Hansen, R. & Balthasar, J. (2004). Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharmac Sciences.* *93*(11):2645-2668.

Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Borkow, G., Ovadia, M., Tarkowski, A. & Hanson, L. (1994). Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon.* *32*(4): 505-510.

Marcilese, N., Valsecchi, R., Figueiras, H., Camberos, H. & Varela, J. (1964). Normal blood volumes in the horse. *Am J Phys.* *207*(1):223-227.

McCarthy, K., Yoong, Y. & Simister, N. (2000). Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: A system to study protein transport across epithelia. *J Cell Science.* *113*: 1277-1285.

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):1-10.

Ober, R., Radu, C., Ghetie, V. & Ward, S. (2001). Differences in promiscuity for antibody-FcRn interaction across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunology.* *13*(12):1551-1559.

Otero, R., Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Núñez, V., Díaz, A., Miranda, E., Uribe, F., Silva, J., Ospina, J., Medina, Y., *et al.* (1999). A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snakebites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon.* *37*(6): 895-908.

Pépin, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M. & Scherrmann, J.M. (1995). Snake F(ab')₂ antivenom from hyperimmunized horse: pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administration in rabbits. *Pharmaceut Res.* *12*(10): 1470-1473.

Pépin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J. & Scherrmann, J.M. (1996). Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom F(ab')₂-scorpion venom interactions. *Toxicol Appl Pharmacol.* *141*(1): 272-277.

Pérez, A., Rucavado, A., Sanz, L., Calvette, J. & Gutiérrez, J.M. (2008). Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Braz J Med Biol Res.* *41*:12-17.

Quesada, L., Sevcik, C., Lomonte, E., Rojas, E. & Gutiérrez, J.M. (2006). Pharmacokinetics of whole IgG equine antivenom: Comparison between normal and envenomed animals. *Toxicon.* *48*(3):255-263.

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. *J Pharmacol Exp Ther.* *281*(1): 1-8.

Rivière, G., Choumet, V., Saliou, B., Debray, M. & Bon, C. (1998). Absorption and elimination of viper venom after antivenom administration. *Pharmacol Exp Ther.* *285*(2): 490-495.

Rojas, G., Espinoza, M., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. (1990). Effect of storage temperature on the stability of the liquid polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon.* *28*(1): 101-105.

Rojas, G., Jiménez, J. & Gutiérrez, J.M. (1994). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon.* *32*(3): 351-363.

Rosso, J.P., Vargas-Rosso, O., Gutiérrez, J.M., Rochat, H. & Bougis, P. (1996). Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur J Biochem.* *238*:231-239.

Rovira, M.E., Carmona, E. & Lomonte, E. (1992). Immunoenzymatic quantitation of antibodies to *Bothrops asper* myotoxins after polyvalent antivenom administered in mice. *Brazilian J Med Biol Res.* 25:23-33.

Rucavado, A., Escalante, T., Franceschi, A., Chaves, F., León, G., Cury, Y., Ovidia, M. & Gutiérrez, J.M. (2000). Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. *Am J Trop Med Hyg.* 63(5):313-319.

Rucavado, A., Soto, M., Kamiguti, A., Theakston, R., Fox, J., Escalante, T. & Gutiérrez, J.M. (2001). Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component of the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. *Thromb Haemost.* 85(4):710-715.

Rucavado, A. (2006). Componentes del veneno de *Bothrops asper* que afectan la hemostasis y su papel en el desarrollo del síndrome hemorrágico. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias (PhD), con énfasis en Ciencias Biomédicas. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Sasa, M. & Vasquez, S. (2003). Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon* 41:19-22.

Shargell, L. & Yu, A. (1999). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill/Appleton & Lange. Cuarta edición.

Scherrmann, J.M. (1995). Antibody treatment of toxin poisoning: recent advances. *J Toxicol Clin Toxicol.* 32(4): 363-375.

Scherrmann, J.M. (2000). Biodynamics of the antigen-antibody reaction in vivo. *Bull Acad Natl Med.* 184(3): 637-646.

Seifert, A. & Boyer, L. (2001). Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. *Ann Emerg Med.* 37:189-185.

Sevcik, C., Díaz, P. & D'Suze, G. (2008). On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production. *Toxicon*. 51:10-16.

Sitprija, V. (2006). Snakebite nephropathy. *Nephrology*. 11(5):442-448.

Smith, D., van der Waterbeemd, H. & Walker, D. (2001). *Pharmacokinetics and Metabolism in drug design*. Wiley-VCH.

Solórzano, A. (2004). *Serpientes de Costa Rica: distribución, taxonomía e historia natural*. 1era edición. Heredia, Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad. 792 p.

Teeling, J., Jansen-Hendricks-T., Kuijpers, T., de Haas, M., van de Winkel, J., Hack, E. & Bleeker, W. (2001). Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood*. 98(4):1095-1099.

Vani, J., Ellulu, S., Negi, V., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M., Bayary, J. & Kaveri, S. (2008). Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. *Autoimmunity Reviews*. 7(6):440-444.

Villalobos, J. (2008). *El envenenamiento ofídico en animales en el continente Americano: serpientes, venenos, patología y tratamiento*. Menevilla.

Wasserman, R., Church, J., Peter, H., Sleasman, J., Melamed, I., Stein, M. & Bichler, J. (2009). Pharmacokinetics of a new 10% intravenous immunoglobulin in patients receiving replacement therapy for primary immunodeficiency. *European J Pharm Sci*. 37(3-4):272-278.

Welling, P. (1997). *Pharmacokinetics: processes, mathematic, and application*. Segunda edición. American Chemical Society. 393 pp.

White, J. (2005). Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. 45(8):951-967.

Zychar, B.C., Castro, N, Marcelino, J. & Gonçalves, L. (2008). Phenol used as a preservative in *Bothrops* antivenom induces impairment in leukocyte-endothelial interactions. *Toxicon*. 51(7):1151-1157.