



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS

Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular

BIODISTRIBUCIÓN DE FRAGMENTOS DE
INMUNOGLOBULINAS TIPO F(ab)₂ EN RATONES, POR
ANÁLISIS DE IMÁGENES

T E S I S

QUE PRESENTA:

TANIA CORKIDI ZAJUR

Para obtener el Grado de:
LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de la tesis:

Dr. Alejandro Alagón Cano, Instituto de Biotecnología, UNAM
CUERNAVACA, MORELOS

ENERO 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

Al programa del PAPIIT-DGAPA IN207218 (Investigación de Venenos de Serpientes para el Mejoramiento de Antivenenos) y al programa del FORDECYT-CONACYT 303045 (Venenos y Antivenenos) por el apoyo brindado para realizar el proyecto.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, por la dirección del proyecto, y por su manera tan singular de hacerme crecer y conocer un poco más sobre cómo es la verdadera investigación científica.

Al técnico Felipe Olvera Rodríguez y al Biol. Irving Archundia Jiménez, por el apoyo brindado durante la realización de los experimentos.

Al Dr. Edson Norberto Cárcamo Noriega, por su tiempo dedicado a responder mis interminables preguntas y por su apoyo durante la preparación de la presentación del proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus acertadas observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del proyecto.

En especial a la M.C. Verónica Rojo León, por toda su paciencia y calidez humana al enseñarme a realizar los experimentos, a observar los resultados y a generar preguntas importantes durante el proyecto.

A mis padres y a mi hermano, que con su amor incondicional me hacen crecer y creer en mí misma, me hacen sentir que puedo afrontar todos los retos que me presenta la vida.

RESUMEN

Los antivenenos siguen siendo la manera más eficiente para el tratamiento de los envenenamientos. Sin embargo, estudios de cinética y distribución son necesarios para mejorar su eficiencia, seguridad, y para optimizar su uso. En este trabajo se realiza el análisis de biodistribución de fragmentos de inmunoglobulina de tipo $F(ab')_2$ en ratones, a nivel global y en órganos, con la utilización de fluorescencia y utilizando un sistema que permite capturar imágenes a diferentes tiempos durante los experimentos. Los fragmentos $F(ab')_2$ fueron marcados con un fluoróforo, y se analizó la distribución utilizando dos vías de administración diferentes (intravenosa -I.V. e intraperitoneal -I.P.) con el fin de comparar las dos vías. También se analizó la biodistribución del fluoróforo libre en ratones para comparar las diferencias tanto en la distribución como en las vías de eliminación. Se encontró que no hay diferencias en la distribución de $F(ab')_2$ en los órganos de los ratones administrados por vía I.V. o por vía I.P. Sin embargo, la distribución global presentó diferencias principalmente debido a la acumulación de fluorescencia en el sitio de inyección. Con respecto a la eliminación, los ratones inyectados con el fluoróforo libre eliminaron la mayor parte de la fluorescencia por orina a las 24 h de la inyección, mientras que los ratones con $F(ab')_2$ no eliminaron los fragmentos por orina, e incluso a las 72 h de la inyección hubo señal de fluorescencia.

ÍNDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	8
1.2 Objetivo General.....	8
1.3 Objetivos particulares.....	9
Capítulo 2. ANTECEDENTES	9
Capítulo 3. METODOLOGÍA	13
3.1 Purificación de F(ab') ₂ utilizando cromatografía por filtración en gel....	13
3.2 Diálisis y Liofilización.....	15
3.3 Marcaje de F(ab') ₂ con Alexa Fluor 790 y obtención de Alexa Fluor 790 libre.....	15
3.4 Cálculo de DOL (Grado de Marcaje o “ Degree of Labeling”).....	17
3.5 Ratones en el sistema “In Vivo Xtreme Bruker”.....	18
Capítulo 4. RESULTADOS	19
4.1 Órganos obtenidos para el análisis de datos y cantidades administradas.....	19
4.2 Gráficas de distribución de F(ab') ₂ en órganos.....	22
4.3 Disección y fluorescencia en orina.....	27

4.4 Dinámica general de F(ab') ₂ marcados con Alexa Fluor 790 con vía I.V. e I.P.....	31
4.5 Dinámica general de Alexa Fluor 790 libre con vía I.V. e I.P.....	37
Capítulo 5. DISCUSIÓN.....	42
Capítulo 6. CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
APÉNDICE.....	48

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A_{280 nm} (Absorbancia a 280 nm)

A_{785 nm} (Absorbancia a 785 nm)

C.F (Factor de corrección)

DOL (Grado de marcaje o “Degree of labeling”)

F (Fluoróforo)

Fab (Fragmento de unión a antígeno)

F(ab')₂ (Fragmento de unión a antígeno, dos segmentos Fab unidos)

Fc (Fragmento cristalizable)

Fv (Fragmento variable)

IgG (Inmunoglobulina tipo G)

I.M. (intramuscular)

I.P. (Intraperitoneal)

I.V. (Intravenosa)

kDa (Kilodalton)

[P] (Concentración de proteína)

MPM (Marcador de peso molecular)

P (Proteína)

ϵ (Coeficiente de extinción molar)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Obtención de órganos con $F(ab')_2$

Tabla 2. Obtención de órganos con Alexa Fluor 790 libre.

Tabla 3. Cantidades de $F(ab')_2$ administradas (n moles).

Tabla 4. Cantidades de Alexa Fluor 790 libre administradas (n moles).

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Fragmentos de IgG.

Fig. 2 Gráfica de lecturas del espectrómetro.

Fig. 3 Gel SDS PAGE 12%.

Fig. 4 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.V. en ratones macho.

Fig. 5 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.V. en ratones hembra.

Fig. 6 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.P. en ratones macho.

Fig. 7 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.P. en ratones hembra.

Fig. 8 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de cada uno de los ratones examinados.

Fig. 9 Comparación de la distribución de $F(ab')_2$ en órganos en vía I.V. e I.P.

Fig. 10 Órganos con $F(ab')_2$.

Fig. 11 Órganos con Alexa Fluor 790.

Fig. 12 Fluorescencia en orina.

Fig. 13 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V. en ratón macho.

Fig. 14 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V. en ratón hembra.

Fig. 15 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.P. en ratón macho.

Fig. 16 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.P. en ratón hembra.

Fig. 17 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.V., en ratón macho.

Fig. 18 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.V., en ratón hembra.

Fig. 19 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.P., en ratón macho.

Fig. 20 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.P., en ratón hembra.

LISTA DE FIGURAS DE APÉNDICE

Fig. A1 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de ratones macho, vía I.V.

Fig. A2 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de ratones hembra, vía I.V.

Fig. A3 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de ratones macho, vía I.P.

Fig. A4 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de ratones hembra, vía I.P.

Fig. A5 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V., en ratón macho.

Fig. A6 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V., en ratón hembra.

Fig. A7 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.P., en ratón macho.

Fig. A8 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.P., en ratón hembra.

1. INTRODUCCIÓN

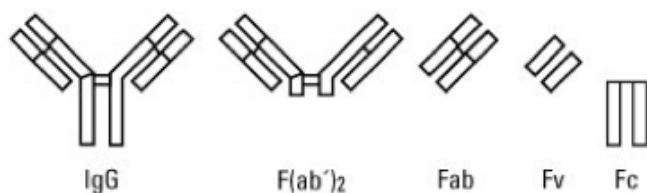
Las mordeduras y picaduras de animales venenosos representan un problema de salud pública en todo el mundo, ya que el envenenamiento puede tener graves consecuencias como daño en los tejidos, inhabilitación de los mismos e incluso muerte, si no son tratadas adecuadamente. Las consecuencias del envenenamiento a su vez tienen implicaciones sociales y económicas que hacen que la investigación sobre venenos y antivenenos sea cada vez más necesaria (Gutiérrez J.M et al., 2003). La inmunoterapia pasiva fue descubierta en 1894 y hoy en día sigue siendo la manera más eficiente para el tratamiento de los envenenamientos. Sin embargo, estudios de farmacocinética y biodistribución de antivenenos siguen siendo necesarios para mejorar su eficiencia, seguridad, y sobre todo, para optimizar su uso durante la inmunoterapia. Por otra parte, algunas de las características de la administración de los antivenenos, como el tiempo de inicio del tratamiento después de la picadura o mordedura de un animal venenoso y la vía de administración debe basarse en un amplio entendimiento del proceso de neutralización en el organismo. De esta manera, el antiveneno correcto puede emplearse dependiendo del tipo de envenenamiento (Rivière, G. et al., 1997).

Los antivenenos deben tener ciertas características para ser ideales: alta capacidad neutralizante ante componentes tóxicos de los venenos, volumen de distribución para poder neutralizar toxinas absorbidas, una alta vida media en la circulación para promover la redistribución de las toxinas que no estén en el

sistema vascular, entre otras (Fry B.G., 2015). Específicamente, el volumen de distribución se refiere a la propiedad de un fármaco de permanecer en el plasma o de redistribuirse a los compartimentos de los tejidos. El volumen de distribución indica la relación que hay entre la concentración de fármaco en el cuerpo, con respecto a la concentración de fármaco en el plasma, lo cual es un parámetro importante en los estudios farmacocinéticos (Oie, S., 1986; Smith, D.A. et al., 2015; Toutain, P.L. & Bousquet-Mèlou, A., 2004).

Un antiveneno consiste en la administración de anticuerpos producidos por animales hiperinmunizados contra las toxinas del veneno de alguna especie específica o alguna cercana (Fry B.G., 2015). La hiperinmunización consiste en la generación de grandes cantidades de anticuerpos que reconocen toxinas específicas. Existen antivenenos dirigidos a toxinas de bajo peso molecular como las de escorpiones y otros antivenenos dirigidos a toxinas de alto peso molecular como las toxinas principales de *Latrodectus* o *Loxosceles* entre otros. Existen los antivenenos monovalentes, que están hechos con venenos de las mismas especies y existen antivenenos polivalentes generados para neutralizar venenos de diferentes especies. Dado que existen diferentes tipos de toxinas, de bajo y alto peso molecular, los antivenenos que se generan son diferentes entre sí y contienen moléculas de diferente peso molecular que tienen propiedades y perfiles farmacocinéticos distintos; lo que tiene implicaciones en el efecto del antiveneno. El perfil farmacocinético, la especificidad y la capacidad de llegar al blanco en un organismo *in vivo* será lo que defina la eficiencia del antiveneno (Gutiérrez J.M et

al., 2003). Con respecto al peso molecular del antiveneno, existen tres principales formatos de antivenenos: IgG, F(ab')₂ y Fab. Las IgGs son proteínas globulares que tienen un peso de 150 kDa. También llamadas inmunoglobulinas, están compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por al menos 15 puentes disulfuro. Las IgG tienen dos regiones: el fragmento cristalizante o Fc y dos regiones Fab de unión a antígeno de 50 kDa, juntos F(ab')₂ de 100 kDa. En la punta de Fab, en el extremo amino terminal de las cadenas ligeras y pesadas, se encuentra la región hipervariable, la cual interactúa directamente con el antígeno (Fig. 1) (Fry B.G., 2015).



¹**Fig. 1 Fragmentos de IgG.** Representación de fragmentos de IgG, donde en orden se muestran IgG, F(ab')₂, Fab, Fv y Fc.

Existen antivenenos de primera, segunda y tercera generación. Los de primera generación consisten en la administración al paciente del suero del animal hiperinmunizado prácticamente sin modificaciones. Este tipo de antivenenos causaban reacciones adversas, ya que no solo contenía IgGs específicas para el antígeno, sino que contenía 200 o más proteínas del suero del animal. Los

¹ Imagen adquirida de: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/antibody-fragmentation.html>.

antivenenos de segunda generación consisten en inmunoglobulinas purificadas de suero, lo cual disminuye drásticamente los efectos adversos. En gran parte, la seguridad de los antivenenos de segunda generación depende de la calidad y efectividad de la purificación. Por último, los antivenenos de tercera generación consisten en la digestión enzimática de IgGs, retirando así los fragmentos Fc para la obtención de fragmentos Fab o $F(ab')_2$ (Fry B.G., 2015). La región Fc está involucrada en la respuesta del sistema inmune. Es la región responsable de la función efectora de los anticuerpos. Por lo mismo, la región Fc es responsable de la activación del sistema inmune cuando se administra al paciente y por lo tanto, responsable de la respuesta adversa (Alagón A., 2002). Así, los antivenenos de tercera generación eliminan ese factor, dejando únicamente las regiones implicadas en la neutralización de las toxinas. Sin embargo, aunque se aumente la seguridad del antiveneno retirando esta zona, la farmacocinética, absorción, tiempo de residencia y eliminación, varía considerablemente entre IgG y $F(ab')_2$ (Alagón A., 2002). En el presente trabajo, se utilizará un antiveneno de tercera generación, del tipo $F(ab')_2$.

La farmacocinética se define como la rama de la ciencia que se enfoca en el proceso de absorción, distribución y eliminación de una sustancia o molécula en un cuerpo. Las propiedades que tengan las moléculas y su mecanismo de acción generarán ciertas propiedades farmacocinéticas y por lo tanto, esto tendrá un efecto en la farmacodinámica, lo cual se refiere a los efectos fisiológicos y bioquímicos del fármaco en el organismo. Los estudios farmacocinéticos de

antivenenos son importantes porque el desajuste o diferencia que puede existir entre la cinética de un veneno y un antiveneno tiene repercusiones en pacientes que incluso después de haber sido tratados con antiveneno, presentan síntomas de envenenamiento. En los estudios farmacocinéticos, los distintos modelos pueden representar gran variación, es decir, éstos pueden variar dependiendo del modelo utilizado. Se sabe que la región Fc de IgG tiene influencia en eliminación y vida media, ya que esta región interactúa con receptores del sistema inmune. Esto también puede variar entre especies; por ejemplo, los anticuerpos murinos en humano tienen una vida media más corta que cuando son anticuerpos quiméricos o humanizados. En la administración de un antiveneno, las proteínas endógenas del organismo podrían modificar la farmacocinética, pero por lo general, el antiveneno administrado de manera intravenosa neutraliza las toxinas rápidamente impidiendo interacciones con otras moléculas. Uno de los factores más importantes para la biodistribución de las moléculas es su peso y tamaño. De hecho, es el aspecto predominante en la biodistribución y eliminación de antivenenos. Las diferencias en los perfiles farmacocinéticos de los antivenenos son de alta relevancia con respecto al tratamiento del envenenamiento ya que sus volúmenes de distribución y vida media son parámetros cruciales para que funcionen de manera efectiva. Estudios muestran que Fab y F(ab')₂ tienen mayor distribución que IgG pero que Fab presenta una vida media menor que los otros dos formatos fisicoquímicos de antivenenos. Otros estudios proponen también que Fab se distribuye en espacio extravascular y que por su bajo peso molecular y tamaño, éste puede entrar en regiones profundas de tejidos para neutralizar

toxinas. Mencionan que una rápida distribución de los antivenenos de bajo peso molecular también conlleva a una eliminación más rápida. Esto implica que el antiveneno se eliminaría más rápido que las toxinas de un veneno. Por otra parte, IgG tiene un menor volumen de distribución y menor rapidez que los otros formatos, y por su tamaño y peso, no puede neutralizar toxinas que ya hayan sido absorbidas en diferentes tejidos, aunque por lo mismo, IgG tiene una vida media mayor en el organismo y baja velocidad de eliminación, lo cual provoca que la actividad del antiveneno permanezca en el organismo por horas. En cambio, $F(ab')_2$ es un “punto intermedio” entre IgG y Fab, con la amplia distribución de Fab y la vida media lo suficientemente larga como IgG para la propia neutralización de las toxinas (Fry B.G., 2015). Sobre la eliminación, se sabe que el catabolismo de IgG sucede principalmente en hígado e intestino; para $F(ab')_2$ sucede en riñones e intestino, mientras que para Fab sucede en los riñones principalmente. Fab se filtra rápidamente por los glomérulos de los riñones, mientras que $F(ab')_2$ e IgG no pueden ser filtrados (no son eliminados por orina), permaneciendo así más tiempo en circulación (Paniagua D. et al, 2019). Por otra parte, se sabe que el catabolismo de anticuerpos sucede también difusamente en todo el cuerpo, estando implicados la piel, los músculos y tejidos periféricos. Sin embargo, es necesario evaluar las vías de eliminación y catabolismo porque pueden existir diferencias significativas con respecto al tipo de anticuerpo o fragmento utilizado, el origen de los mismos y el modelo experimental (Gutiérrez J.M et al., 2003).

Los antivenenos además de administrarse lo más pronto posible después de las picaduras o mordeduras, deben administrarse de manera intravenosa, ya que así tiene una mayor difusión en menor tiempo. IgG y F(ab')₂ actúan mayormente en el torrente sanguíneo, donde se unen con las toxinas. Cuando un anticuerpo se une a una toxina, esto genera un complejo antígeno-anticuerpo mediante el proceso de neutralización, lo cual provoca que las toxinas que se encuentran en el compartimento de los tejidos, salgan para incorporarse al torrente sanguíneo donde serán neutralizadas. Por otra parte, la dosis que se debe administrar depende de varios factores: síntomas que se presenten, tiempo entre la picadura y la administración del tratamiento, título de anticuerpos o de neutralización, la atención médica y si se administraron adyuvantes. Tanto la dosis como la vía de administración son de suma importancia para la eficiencia del antiveneno (Chippaux J.P. et al., 2012).

Las vías de administración tienen gran influencia en la disponibilidad de los antivenenos y de fármacos en general. Incluso dependiendo de la vía, varía la dosis requerida ya que los tiempos de absorción y eliminación tendrán variaciones. A pesar de que la vía parenteral más eficiente para administrar los antivenenos sea la I.V., los antivenenos se administran de manera intramuscular en algunas ocasiones. Como existen diferencias con respecto a la vía de administración, es necesario realizar los estudios cinéticos no solo con diferentes tipos de antivenenos sino que también con diferentes vías de administración (Rowland, M., 1972).

En este trabajo se realizó un estudio para conocer la biodistribución global de un antiveneno de formato $F(ab')_2$ capaz de reconocer las principales toxinas de las arañas de los géneros *Latrodectus*, *Loxosceles* y 4 especies de escorpiones del género *Centruroides*: *Centruroides limpidus*, *Centruroides noxius*, *Centruroides tecomanus* y *Centruroides suffusus*, las cuales son las que representan más peligro para la población de México. Como tal, la especificidad del antiveneno no será relevante para este estudio, pero la utilización de este antiveneno en particular podrá dar pie a futuras investigaciones de cinética de venenos e incluso sobre la cinética de inmunoconjugados *in vivo* para que así el tema de investigación se resuelva con información completa, y se tengan estudios que mejoren nuestro entendimiento del funcionamiento de los antivenenos. Por otra parte, se utilizaron las vías de administración intravenosa (I.V.) e intraperitoneal (I.P.). Ya que el modelo a utilizar (modelo murino) tiene limitaciones como la pequeña cantidad de músculo en los ratones, se realizó la administración por vía I.P., además de que ésta es la segunda vía parenteral más rápida de absorción de antivenenos después de la intravenosa.

1.1 Hipótesis

La biodistribución global de fragmentos $F(ab')_2$ administrados de manera intravenosa (I.V.) e intraperitoneal (I.P.) es diferente.

1.2 Objetivo general

Conocer la biodistribución de fragmentos $F(ab')_2$ en modelo murino *in vivo*, tanto por vía I.V. como I.P.

1.3 Objetivos particulares

- Obtener imágenes de la distribución de $F(ab')_2$ marcados con un fluoróforo a distintos tiempos con la utilización del sistema “In Vivo Xtreme Bruker”, tanto por vía I.V. como I.P.
- Analizar la distribución de los fragmentos $F(ab')_2$ en los órganos al finalizar los experimentos de distribución global.
- Analizar la factibilidad de obtener datos farmacocinéticos por medio del análisis de las imágenes producidas por el sistema “In Vivo Xtreme Bruker”.

2. ANTECEDENTES

En 2016, el grupo del Dr. Baltazar Becerril (Instituto de Biotecnología, UNAM) realizó pruebas preliminares de la difusión del anticuerpo scFv-LR con administración I.P. en modelo murino. Evaluaron la diferencia cinética de difusión entre scFv-LR y $F(ab')_2$ utilizando un fluoróforo para el marcaje covalente de los fragmentos de anticuerpo. Administraron dosis idénticas de los fragmentos de anticuerpos y utilizaron tres ratones para cada experimento. Los ratones fueron sacrificados 30, 60 y 90 minutos después de la administración I.P. Los riñones y el hígado fueron diseccionados y preservados para su análisis. Los órganos se

analizaron en el sistema “In Vivo Xtreme Bruker” midiendo la intensidad de fluorescencia mediante el análisis de imágenes. Posteriormente se analizaron cortes longitudinales de los órganos. Al encontrar mayor presencia de scFv-LR acumulado en el riñón a los 60 minutos, los resultados sugirieron que hay una mayor rapidez en la biodistribución y en la eliminación de scFv-LR comparado con $F(ab')_2$. Por lo tanto, scFv-LR se considera un formato adecuado de anticuerpo cuando se busca la rapidez de distribución y eliminación, como para casos graves de intoxicación (como en las picaduras de escorpión), pero no adecuado para casos en los que se necesite que permanezcan por más tiempo en un organismo (como en el caso de mordeduras de serpientes).

Ya que el tamaño y la forma de las moléculas tienen repercusiones en la biodistribución y farmacocinética, Surinder K Batra et al., realizaron experimentos modificando anticuerpos con ingeniería genética y radio-marcaje para conseguir una biodistribución ideal para que éstos logaran llegar a regiones específicas en un organismo, como los tumores. Realizaron pruebas en modelo murino *in vivo* y también pruebas *in vitro* con líneas celulares observando la capacidad anti tumoral (Batra S.K. et al., 2002).

En el campo de la inmunoterapia contra el cáncer, se ha logrado humanizar anticuerpos monoclonales murinos dirigidos a una glicoproteína de tumor para que éstos no tuvieran una respuesta inmunológica en el humano y tuvieran la especificidad requerida para el reconocimiento del tumor. Cambiaron la cadena ligera murina por una línea de cadena ligera humana y realizaron estudios

farmacocinéticos y de biodistribución. Mencionan que las moléculas scFv tienen la ventaja de penetrar tumores y se eliminan rápidamente. Los estudios de biodistribución muestran que los anticuerpos monoclonales murinos y los del anticuerpo modificado tienen una distribución, vida media y eliminación similares (Pavlinkova, G. et al., 2000).

Los venenos y antivenenos poseen características farmacocinéticas distintas. Estas diferencias hacen que el veneno no sea neutralizado eficientemente y que por lo tanto, se presenten los efectos del envenenamiento. Precisamente porque existe esta diferencia, se realizan estudios de cinética de venenos y de antivenenos. Por ejemplo, estudios con veneno de *Walterinnesia aegyptia* muestran que las toxinas presentan mayor disposición y se adentran más rápidamente en los tejidos, es decir que se absorben y distribuyen más rápidamente que los fragmentos de IgG. Los estudios se realizan en conejos y ratones, por lo que mencionan que el modelo experimental puede generar ciertas variaciones en los perfiles cinéticos. Se utilizan dos vías de administración diferentes, mencionando que la vía I.V. es la más eficiente para los antivenenos. Finalmente concluyen que el formato $F(ab')_2$ es más conveniente para implementar en la inmunoterapia (Ismail, M. et al., 1997).

La vía de administración está directamente relacionada con la eficiencia del antiveneno. Estudios realizados en ratas envenenadas con toxinas de *Androctonus australis (Hector)* muestran cómo varía la eficiencia de los formatos de antivenenos Fab y $F(ab')_2$ con diferentes vías de administración (Hammoudi-

Triki, D. et al., 2007). Observan que $F(ab')_2$ es más eficiente por vía I.V. mientras que Fab es más eficiente por vía I.M. Por otra parte, muestran que Fab es más efectivo que $F(ab')_2$ para prevenir los primeros síntomas de envenenamiento por cualquier vía de administración utilizada, aunque con una administración I.P., ambos formatos de antivenenos son de igual efectividad para evitar los síntomas de envenenamiento avanzado. Estos resultados sugieren que para mejorar el tratamiento contra la picadura de escorpión, se podrían administrar una mezcla de Fab y $F(ab')_2$, de esta manera si el antiveneno no se pudiera administrar de manera I.V. y si se administrara de manera I.M., el Fab tendría un mejor efecto con respecto a $F(ab')_2$.

Por otra parte en 2016, Irene Vergara (Instituto de Biotecnología, UNAM) y colaboradores realizaron un estudio sobre la biodistribución de una β -neurotoxina de serpiente (*Micrurus fulvius*) en ratas y ovejas anestesiadas. La toxina fue rastreada en el sistema linfático y para esto administraron por vía subcutánea β -neurotoxina marcada con ^{67}Ga en ratas. Utilizaron un sistema híbrido: SPECT/CT (“Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography”), el cual permite rastrear moléculas *in vivo*. En el modelo de rata encontraron que la toxina se acumula en nodos lumbares y poplíteos. También proponen que el lugar de la mordedura de serpiente permanece como un depósito de veneno que se libera incluso varias horas después de la mordedura. Mencionan que el sistema linfático es clave para la distribución de biomoléculas y que en general, la

biodistribución depende del tamaño, la especificidad, afinidad, solubilidad y vía de administración de las moléculas (Vergara I. et al., 2016).

El sistema linfático participa en la respuesta inmune a antígenos externos. Por esto, se desarrolló una manera de teñir nodos linfáticos en roedores con el colorante Azul de Evans. De esta manera se obtiene información de los nodos linfáticos iliacos, axilares, poplíteos e inguinales de roedores (Harrell, M.I., 2008).

En este trabajo se utilizará este método para teñir nodos axilares y poplíteos de los ratones para ver el papel del sistema linfático en la distribución de $F(ab')_2$.

3. METODOLOGÍA

3.1 Purificación de $F(ab')_2$ utilizando cromatografía por filtración en gel

Para la purificación de los fragmentos $F(ab')_2$ se utilizó cromatografía de filtración en gel, Sephacryl S-300, a partir de una muestra liofilizada del antiveneno AAA2013-BB-IND 15757. A continuación se dan las especificaciones de la columna y el protocolo utilizado:

Especificaciones de la columna: Columna de vidrio 1.7 m de altura x 2 cm de diámetro. Volumen en columna de Sephacryl S-300: 540 mL.

Protocolo de purificación:

1. Una vez empacada la columna se equilibra con 3 volúmenes de PBS.

2. Correr la columna a un flujo de 0.5 ml/min.
3. Cargar 2.5 mL de $F(ab')_2$ a 12.9 mg/mL (32 mg).
4. Una vez colectadas las fracciones, se lee la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro y se grafica (Fig. 2).

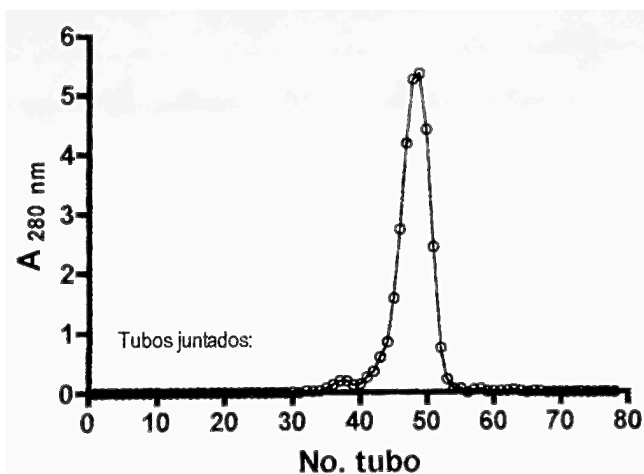


Fig. 2 Gráfica de lecturas del espectrofotómetro. Gráfica de las lecturas de las muestras obtenidas de la filtración en gel de $F(ab')_2$, donde el eje Y muestra la absorbancia a 280nm y el eje x indica el número de tubo. Las muestras se colectaron en tubos de ensayo y se juntaron las fracciones de los tubos No. 48 y 49 ya que presentaban la mayor absorbancia a 280 nm.

Una vez purificados los anticuerpos por la columna de filtración, se realizó un gel de electroforesis (SDS-PAGE 12% acrilamida) para verificar la purificación de los fragmentos de anticuerpo (Fig. 3).

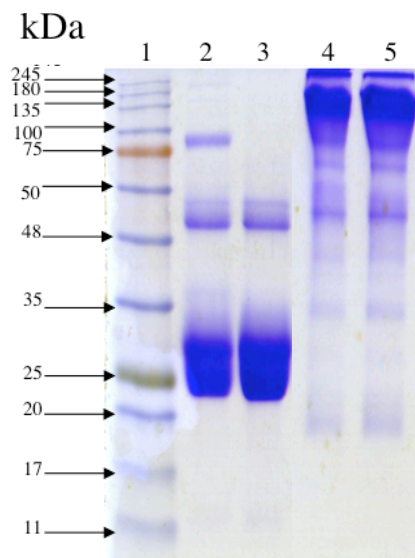


Fig. 3 Gel SDS PAGE 12%. Gel de electroforesis donde los carriles 2 y 3 se encuentran en **condiciones reductoras** y los carriles 4 y 5 en **condiciones no reductoras**. Los carriles contienen lo siguiente: **1.** MPM (a la izquierda de este se muestra el peso molecular en kDa). **2.** F(ab')₂ antes de la columna de Sephacryl S300 (15 µg). **3.** F(ab')₂ después de la columna de Sephacryl S300 (15 µg). **4.** F(ab')₂ antes de la columna de Sephacryl S300 (15 µg). **5.** F(ab')₂ después de la columna de Sephacryl S300 (15 µg).

Las muestras purificadas se almacenaron en PBS a 4° C en alícuotas para su uso.

3.2 Diálisis y Liofilización

Para la diálisis, se tomaron 10 mg totales de F(ab')₂ (2.7 ml a 3.8 mg/ml) y se colocó en una membrana para dializar contra una solución 0.1 M de bicarbonato de sodio. Se hicieron 3 cambios de al menos 1 h cada uno. Después, se hicieron dos cambios más contra una solución 0.067 M de bicarbonato de sodio. Una vez dializada la muestra, se hizo la liofilización en un frasco de centelleo.

3.3 Marcaje de F(ab')₂ con Alexa Fluor 790 y obtención de Alexa Fluor 790 libre

El marcaje de F(ab')₂ se realizó con el kit de Invitrogen™ Alexa Fluor™ 790 NHS Ester (Succinimidyl Ester) (Alexa Fluor 790 labeling kit, 785/excitación y 810/emisión) por Thermo Fisher Scientific (REF A20189). Se llevó a cabo el siguiente protocolo para obtener los conjugados:

1. Disolver F(ab')₂ 11 purificado y liofilizado en 1 ml de H₂O (concentración 0.2 M de NaHCO₃).
2. Preparar alícuotas de 0.5 ml a 2 mg/ml (100 µl de F(ab')₂ a 10 mg/ml + 400 µl 0.1 M de NaHCO₃).
3. Añadir 200 µl (a 2 mg/ml) de F(ab')₂ a un tubo de reacción de Alexa Fluor 790. Mezclar por inversión e incubar 1 h a temperatura ambiente.
4. Preparar columna con resina incluida en el kit. Una vez retirado el exceso de líquido, centrifugar la columna a 1,100 x g por 3 min.
5. Añadir la mezcla de reacción a la columna y centrifugar por 7 min. a 1,100 x g.
6. Los conjugados se colectan en el tubo y el exceso de fluoróforo libre queda retenido en la parte alta de la columna.

El fluoróforo libre se obtuvo utilizando las mismas columnas que se usaron para la filtración de los conjugados. Para colectar el fluoróforo libre sobrante en la columna se realizaron se utilizó la centrífuga tres veces de la siguiente manera:

1. 5 min. con 1 ml de NaHCO₃ 0.1 M a 1,100 x g.
2. 5 min. con 400 µl de NaHCO₃ 0.1 M a 1,100 x g.

3. 7 min. con 600 μ l de NaHCO_3 0.1 M a 1,100 x g.

Para asegurar la obtención del fluoróforo libre se realizó un gel de electroforesis (SDS-PAGE 12 % acrilamida), en el cual no se observaron marcas del peso molecular de $\text{F(ab}')_2$.

3.4 Cálculo de DOL (Grado de Marcaje o “Degree of Labeling”)

El cálculo del grado de marcaje se realizó midiendo la absorbancia a 280nm y 785nm y se calculó la concentración de proteína. Después se calculó la relación entre proteína y fluoróforo para obtener el grado de marcaje de cada muestra para la planeación de la dosis a inyectar a cada ratón. Los cálculos se realizaron con las siguientes fórmulas (según el protocolo de marcaje de Alexa Fluor 790):

Cálculo de la concentración molar de $\text{F(ab}')_2$

$$[P] = [A_{280 \text{ nm}} - (A_{785 \text{ nm}} \times C.F_{280 \text{ nm}})] / \epsilon_{\text{F(ab}')_2}$$

Donde [P] es la concentración molar de proteína, $A_{280 \text{ nm}}$ es la absorción de $\text{F(ab}')_2$ a 280 nm, $A_{785 \text{ nm}}$ es la absorción del fluoróforo a 785 nm, $C.F_{280 \text{ nm}}$ es factor de corrección de la absorción a 280 nm (la contribución del fluoróforo para la absorción), $\epsilon_{\text{F(ab}')_2}$ es el coeficiente de extinción molar de $\text{F(ab}')_2$,

Cálculo de DOL

Moles Alexa Fluor 790/ Moles de $\text{F(ab}')_2$ o moles de proteína.

$$F/P = A_{\text{Fluor785 nm}} / \epsilon_{\text{Fluor785 nm}} \times [P]$$

Donde F son moles de fluoróforo, P son moles de proteína, $A_{\text{Fluor785 nm}}$ es la absorbancia del fluoróforo a 785 nm y $\epsilon_{\text{Fluor785 nm}}$ es el coeficiente de extinción molar del fluoróforo.

3.5 “In Vivo Xtreme Bruker”

Una vez obtenidas las muestras marcadas para inyectar, se usaron ratones CD1 machos y hembras de 18-20 g de peso. Los ratones se anestesiaron con isoflurano inhalado al 1-2 % para recolectar las imágenes de la biodistribución. Se tomaron imágenes ventrales y dorsales de la fluorescencia y rayos X a las 0 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h a la mayoría de los ratones inyectados. La mayoría de los ratones inyectados con $F(ab')_2$ fueron sacrificados a las 72 h de la inyección, mientras que los de Alexa Fluor 790 libre fueron sacrificados a las 24 h ya que la eliminación del fluoróforo libre es más rápida y se quería conservar señal de fluorescencia en los órganos después de la disección. Los ratones fueron inyectados con Azul de Evans a 5 mg/ml en PBS 1 X en las 4 patas para teñir los nodos linfáticos axilares y poplíteos. Una vez sacrificados los ratones, los órganos fueron retirados y colocados en una caja de Petri y ésta fue colocada en el sistema In Vivo Xtreme Bruker para adquirir las imágenes para realizar el análisis de la fluorescencia.

Las imágenes se analizaron con el programa para computadora Bruker MI SE. A las imágenes de distribución global se les modificó la escala arbitraria propuesta

por el programa y se cambiaron las unidades a $F/s/mm^2$ (fotones por segundo por milímetro cuadrado) para evitar la saturación y quitar ruido de fondo de las imágenes para tener únicamente la señal del fluoróforo. También se calculó la cantidad de fluorescencia ($F/s/mm^2$) emitida por cada órgano en las imágenes de disección. En Excel se normalizaron los datos y se promediaron las cantidades de fluorescencia emitidas por cada órgano de cada ratón con la misma vía de administración para conseguir las gráficas presentadas en los resultados.

4. RESULTADOS

4.1 Órganos obtenidos para el análisis de datos y cantidades administradas

En la Tabla 1 y Tabla 2 se muestran los órganos obtenidos de los ratones para la cuantificación de la fluorescencia, tanto en ratones con inyección de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 como de Alexa Fluor 790 libre. Se obtuvieron la mayoría de los órganos de cada ratón, a excepción de los nodos linfáticos, peritoneo, piel y a excepción de uno de los ratones macho con inyección I.V., donde sólo se obtuvieron dos de los órganos de interés. La Tabla 3. y Tabla 4. muestran las diferentes dosis administradas a cada ratón (en n moles) de $F(ab')_2$, Alexa Fluor 790 y moles totales.

$F(ab')_2$	H	R	B	Pu	C	N	OR	E	V	Pi	Pe
------------	---	---	---	----	---	---	----	---	---	----	----

H, I.V.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	x
H, I.V.	o	o	o	o	o	x	o	o	o	x	x
M, I.V.	o	o	o	o	o	x	o	o	o	x	x
M, I.V.	o	o	x	x	x	x	o	x	x	x	x
H, I.P.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
H, I.P.	o	o	o	o	o	x	o	o	o	o	o
M, I.P.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	x
M, I.P.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Tabla 1. Obtención de órganos de ratones inyectados con $F(ab')_2$. Las columnas indican las siglas de los órganos que se analizaron: H: Hígado, R: Riñones, B: Bazo, Pu: Pulmones, C: Corazón, N: Nodos linfáticos, OR: Órgano Reproductor, E: Estómago, V: Vejiga, Pi: Piel, Pe: Peritoneo. La primera columna indica el género: H: Hembra, M: Macho, y la vía de administración I.V. o I.P. El círculo indica la obtención del órgano para el análisis de datos mientras que la x representa que no se obtuvo el órgano para el análisis de datos.

Alexa	H	R	B	Pu	C	N	OR	E	V	Pi	Pe
790 libre											
H, I.V.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	x
H, I.P.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
M, I.V.	o	o	o	o	o	x	o	o	o	x	x
M, I.P.	o	o	o	o	o	x	o	o	o	x	x

Tabla 2. Obtención de órganos de ratones inyectados con Alexa Fluor 790 libre. Las columnas indican las siglas de los órganos que se analizaron: H: Hígado, R: Riñones, B: Bazo, Pu: Pulmones, C: Corazón, N: Nodos linfáticos, OR: Órgano Reproductor, E: Estómago, V: Vejiga, Pi: Piel, Pe: Peritoneo. La primera columna indica el género: H: Hembra, M: Macho, y la vía de administración I.V. o I.P. El círculo indica la obtención del órgano para el análisis de datos mientras que la x representa que no se obtuvo el órgano para el análisis de datos.

	n moles de $F(ab')_2$	n moles de Alexa 790	n moles totales administradas de $F(ab')_2$ y Alexa 790
M, I.V. (Fig. 13)	2.90	2.50	5.40
H, I.V. (Fig. 14)	1.40	1.04	2.44
M, I.P. (Fig. 15)	2	1.20	3.20
H, I.P. (Fig. 16)	2	1.20	3.20
M, I.V. (Fig. A5)	2.10	1.83	3.93
H, I.V. (Fig. A6)	1.40	1.04	2.44
M, I.P. (Fig. A7)	1	0.62	1.62
H, I.P. (Fig. A8)	2	1.20	3.20

Tabla 3. Cantidades de $F(ab')_2$ administradas (n moles). La primera columna indica el género: H: Hembra, M: Macho, la vía de administración I.V. o I.P. y entre paréntesis la figura en la que aparece el ratón. La segunda columna indica las n moles de $F(ab')_2$. La tercera indica las n moles de Alexa Fluor 790 y la cuarta indica el total de n moles de conjugado administradas a cada ratón.

	n moles de Alexa 790
M, I.V. (Fig. 17)	0.92
H, I.V. (Fig. 18)	0.92
M, I.P. (Fig. 19)	0.88

H, I.P. (Fig. 20)	0.88
-------------------	------

Tabla 4. Cantidades de Alexa Fluor 790 libre administradas (n moles). La primera columna indica el género: H: Hembra, M: Macho, y la vía de administración I.V. o I.P. La segunda columna indica las n moles administradas de Alexa Fluor 790 libre.

4.2 Gráficas de distribución de $F(ab')_2$ en órganos

En la Fig. 4 se muestran los porcentajes de $F(ab')_2$, repartidos en cada uno de los órganos de los ratones macho inyectados por vía I.V., donde el hígado y riñones muestran que acumularon el 76 % de la fluorescencia total, seguido del aparato reproductor (testículos y epidídimo), con el 9 % de la fluorescencia total.

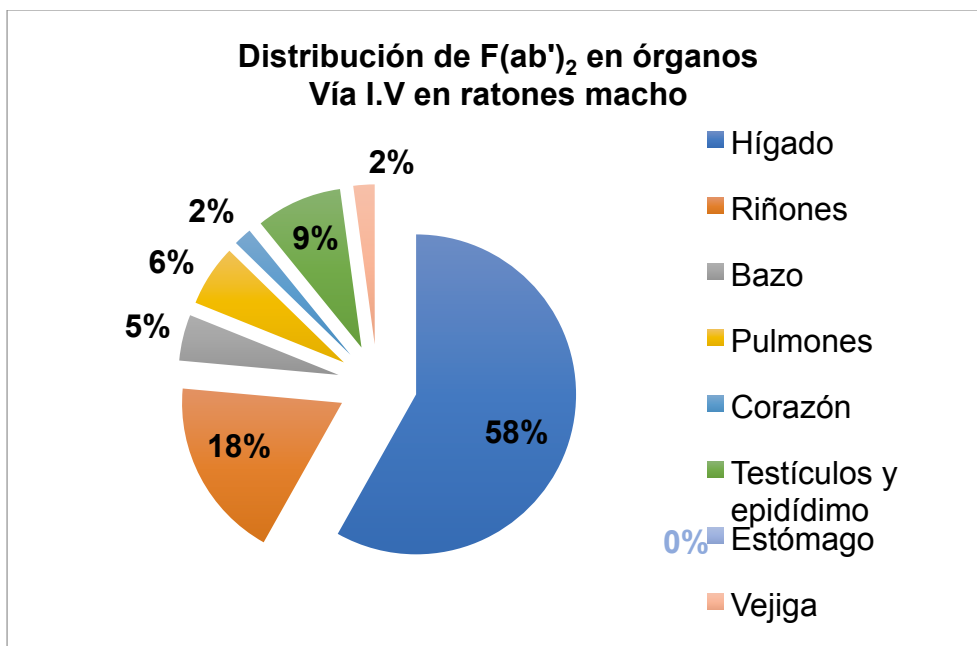


Fig. 4 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.V. en ratones macho. Indica el porcentaje de fluorescencia en cada órgano. Promedio de porcentaje de 2 ratones macho sacrificados a las 72 h de la inyección.

En la Fig. 5 se muestran los porcentajes de $F(ab')_2$, repartidos en cada uno de los órganos de los ratones hembra inyectados por vía I.V., donde el hígado y riñones de nuevo muestran los porcentajes mayores de fluorescencia, siendo juntos el 86 % de la fluorescencia total, de igual manera seguido por el órgano reproductor (ovarios, úteros, cérvix y vagina) con el 13 % de la fluorescencia total.

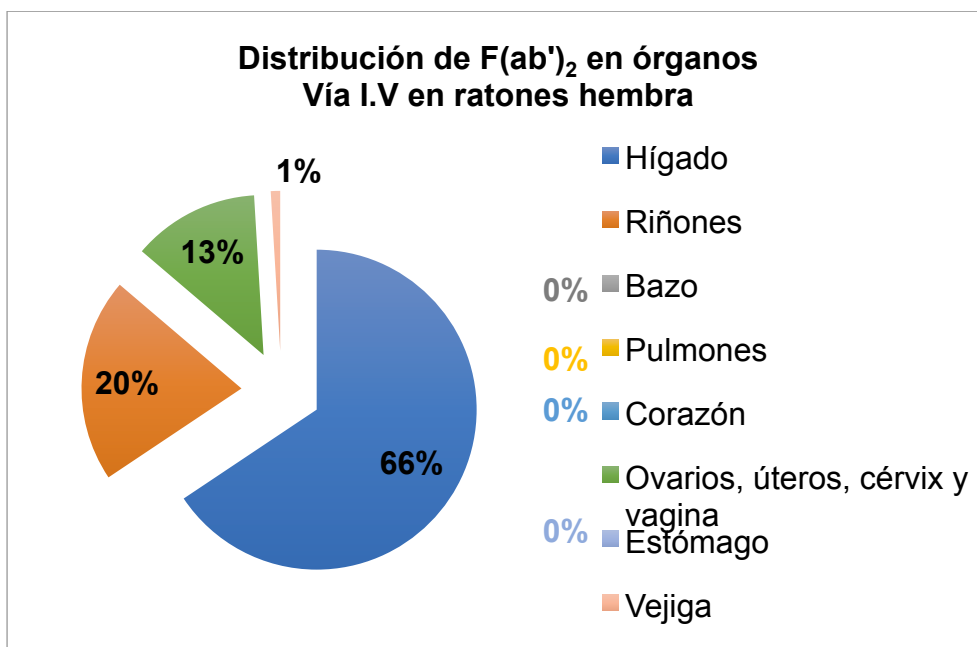


Fig. 5 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.V. en ratones hembra. Indica el porcentaje de fluorescencia en cada órgano. Promedio de porcentaje de 2 ratones hembra sacrificados uno a las 24 h y otro a las 72 h de la inyección.

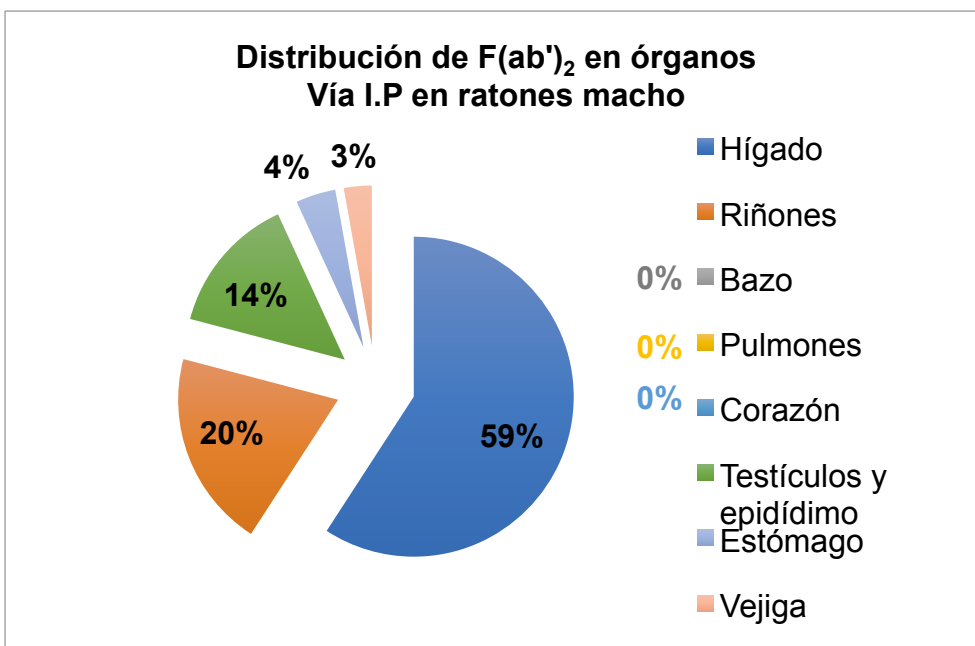


Fig. 6 Distribución de F(ab')₂ en órganos, vía I.P. en ratones macho. Indica el porcentaje de fluorescencia en cada órgano. Promedio de porcentaje de 2 ratones macho sacrificados uno a las 72 h de la inyección.

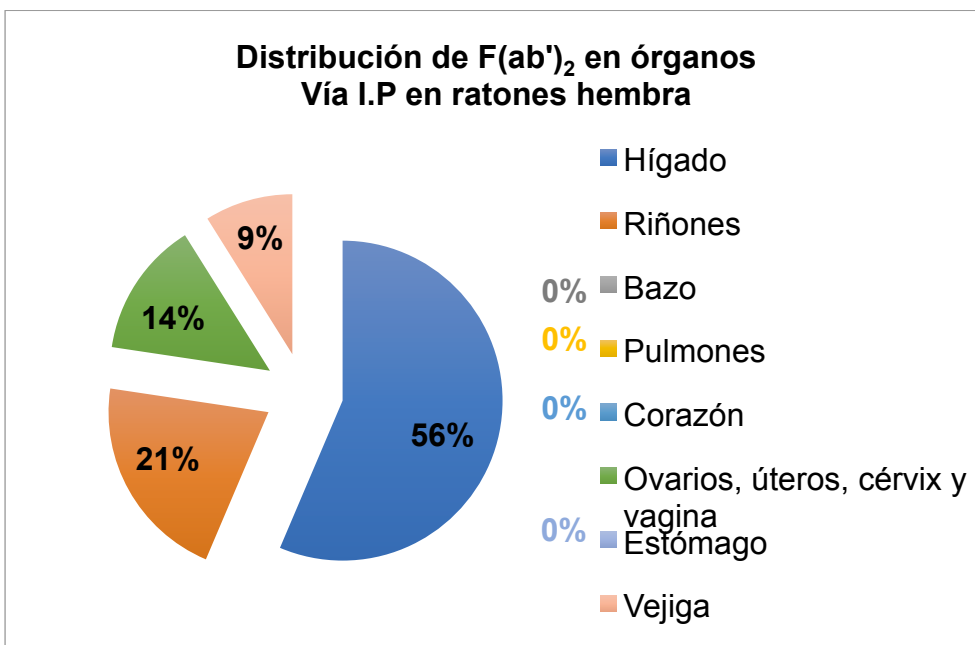


Fig. 7 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, vía I.P. en ratones hembra. Indica el porcentaje de fluorescencia en cada órgano. Promedio de porcentaje de 2 ratones diferentes sacrificados a las 72 h.

En la Fig. 6 y Fig. 7 se muestran los porcentajes de $F(ab')_2$, repartidos en cada uno de los órganos de los ratones macho y hembra, respectivamente, todos inyectados por vía I.P., donde el hígado y riñones nuevamente muestran los porcentajes mayores de fluorescencia. La suma de los porcentajes de ambos órganos en ratones macho es del 79 % de la fluorescencia total, mientras que en ratones hembra es el 77 % de la fluorescencia total. De igual manera el tercer órgano con más fluorescencia es el reproductor, donde en machos y hembras es el 14 % de la fluorescencia total. Gráficas con la misma información de las cuatro gráficas anteriores se encuentran en el apéndice, Fig. A1, Fig. A2, Fig. A3 y Fig. A4 en donde se muestran las gráficas de pastel de cada uno de los ratones. Ya que las dosis inyectadas fueron variables, se pueden observar ligeras variaciones en los porcentajes de fluorescencia en cada órgano. La distribución en órganos fue mayor en el ratón de la Fig. A1, ratón con mayor dosis administrada de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790.

En la Fig. 8 se pueden observar los porcentajes de fluorescencia en cada uno de los órganos en consideración. Se pueden observar los casos individuales de cada ratón, donde es claro que todos tienen tendencias o porcentajes parecidos en cada órgano. Los puntos representando cada uno de los ratones están encimados o cercanos en la misma zona de la gráfica. Por otra parte, la Fig. 9 es la unión de

la información de las figuras 4, 5, 6 y 7 mostrando la distribución de $F(ab')_2$ en órganos, haciendo más fácil la comparación entre las dos vías de administración, I.V. e I.P.

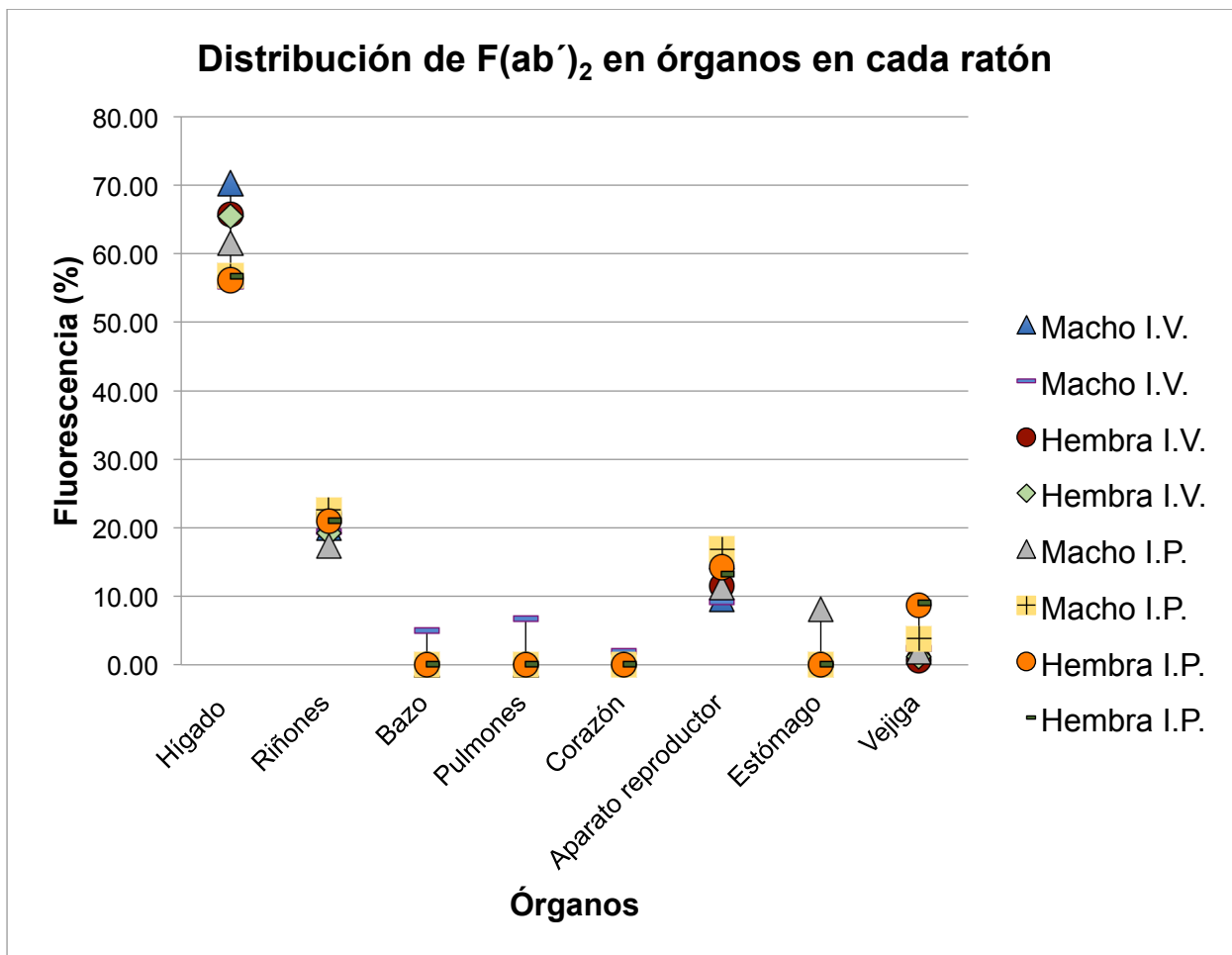


Fig. 8 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de cada uno de los ratones examinados. El eje Y representa la cantidad de fluorescencia en % mientras que el eje X indica cada órgano examinado. Las diferentes figuras representan cada uno de los ratones inyectados con $F(ab')_2$, la mayoría sacrificados a las 72 h de la inyección. En la barra de la derecha se describen sus especificaciones como el género y vía de administración (I.V./ I.P.).

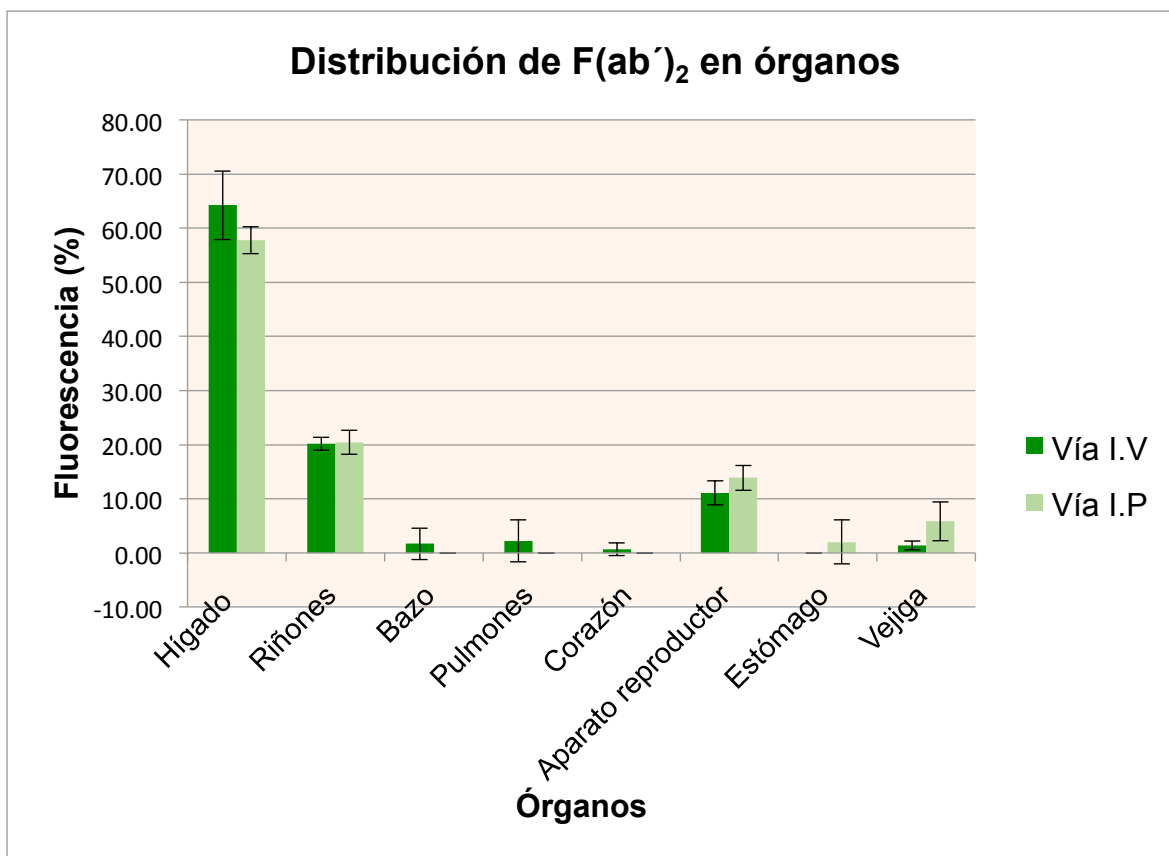


Fig. 9 Comparación de la distribución de $F(ab')_2$ en órganos con vía I.V. e I.P. Cada barra indica el porcentaje de fluorescencia encontrada en cada órgano, donde el total de fluorescencia es la sumatoria de toda la fluorescencia encontrada en los órganos. Cada barra representa un promedio de porcentaje de los órganos 4 ratones para cada una de las vías de administración. Las barras en verde oscuro son de los órganos de los ratones inyectados por vía I.V. mientras que el verde claro es para la vía I.P.

4.3 Disección y fluorescencia en orina

La Fig. 10 muestra los órganos de uno de los ratones hembra que se sacrificó a las 72 h de la administración de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 por vía I.V. Se ve que el $F(ab')_2$ se distribuye principalmente en hígado, riñones y aparato reproductor, mientras que en la Fig. 11, se muestran los órganos de un ratón

macho sacrificado a las 24 h de la inyección con Alexa Fluor 790, donde se ve que sólo en los riñones se acumula el fluoróforo. De igual manera, de los órganos de los 3 ratones inyectados con el fluoróforo ya sea por vía I.V. o I.P., sólo presentaron fluorescencia los riñones, tanto en machos como en hembras. Debido a la observación de que en ratones inyectados con $F(ab')_2$ o con Alexa Fluor 790 por cualquier vía de administración y en cualquier género hay acumulación en los riñones, se tomaron muestras de orina para verificar si las moléculas se eliminan por esta vía (Fig. 12). La orina de los ratones inyectados con $F(ab')_2$ no presentó fluorescencia significativa, mientras que la orina de los ratones inyectados con Alexa Fluor 790 presentó fluorescencia significativa. La muestra de orina de los ratones con $F(ab')_2$ se colectó a las 24 h de la inyección, mientras que la orina de los ratones con Alexa Fluor 790 se colectó y se detectó fluorescencia a las 6 h y 24 h de la inyección, presentando a las 6 h la mayor intensidad.

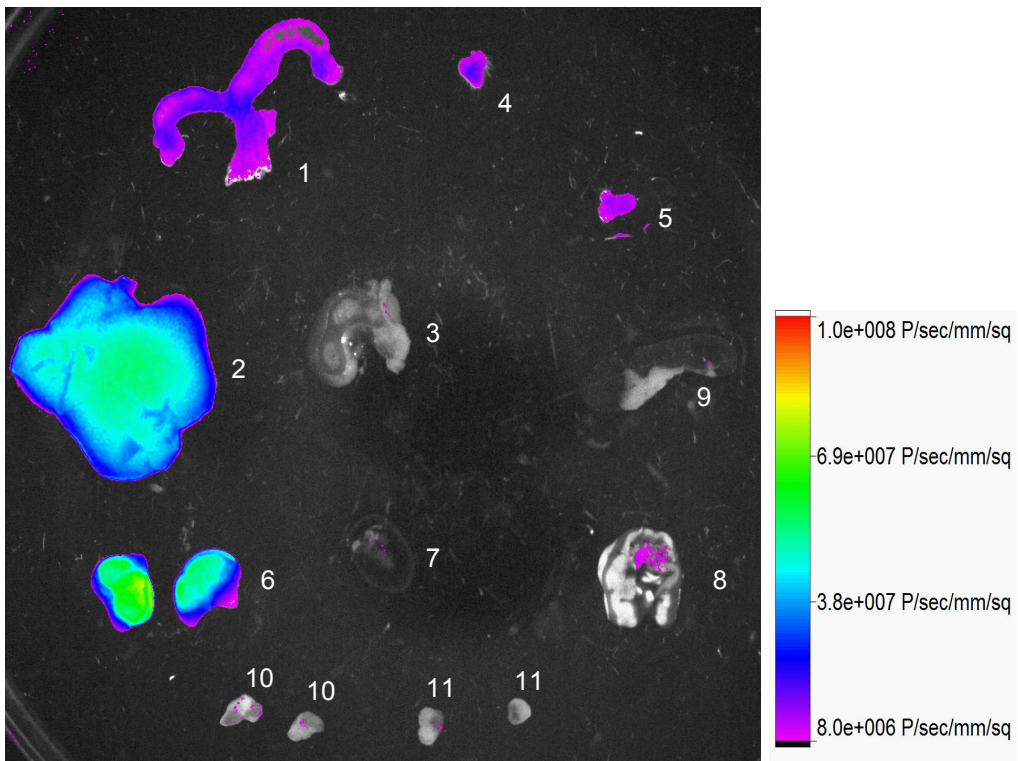


Fig. 10 Órganos con $F(ab')_2$. Imagen de órganos de ratón hembra inyectada por vía I.V. con $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790, sacrificada a las 72 h de la inyección. Fotografía superpuesta con imagen de fluorescencia. Los números son: 1: Ovarios, úteros, cérvix y vagina. 2: Hígado. 3: Estómago. 4: Vulva. 5: Vejiga. 6: Riñones. 7: Corazón. 8: Pulmones. 9 :Bazo. 10 :Nodos linfáticos axilares. 11 : Nodos linfáticos poplíteos.

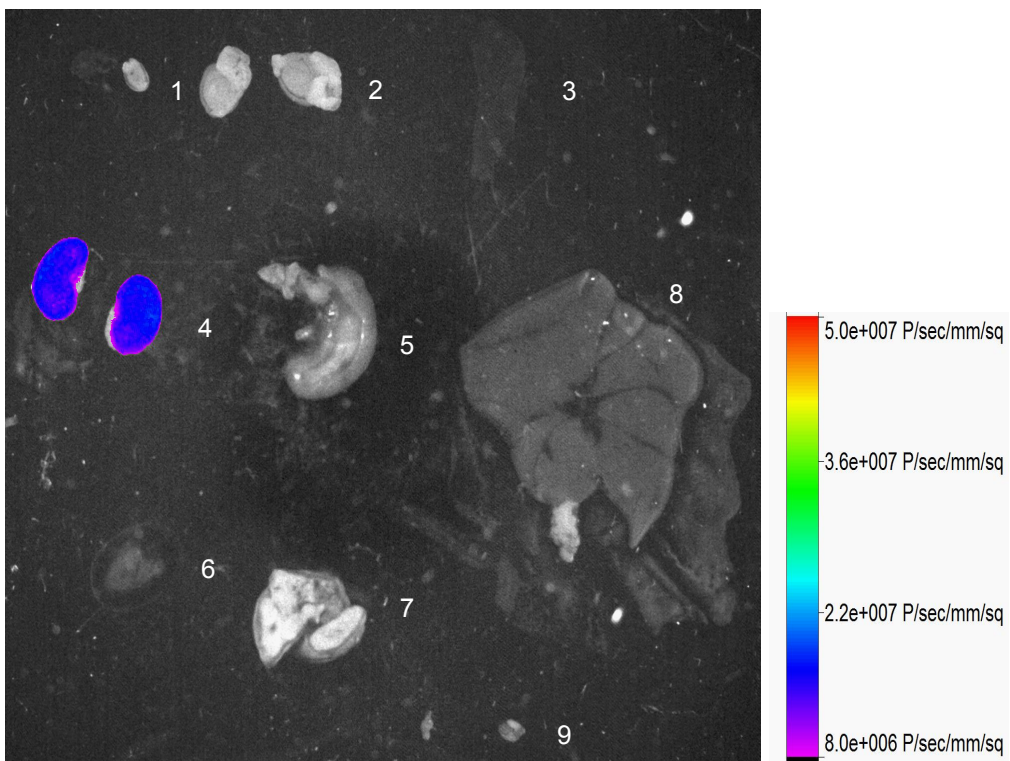


Fig. 11 Órganos con Alexa Fluor 790. Imagen de órganos de ratón macho inyectada por vía I.V. con Alexa Fluor 790, sacrificado a las 24 h de la inyección. Fotografía superpuesta con imagen de fluorescencia. Los números son: 1: Vejiga. 2: Testículos. 3: Bazo. 4: Riñones. 5: Estómago. 6: Corazón. 7: Pulmones. 8: Hígado. 9 :Nodos linfáticos axilares.

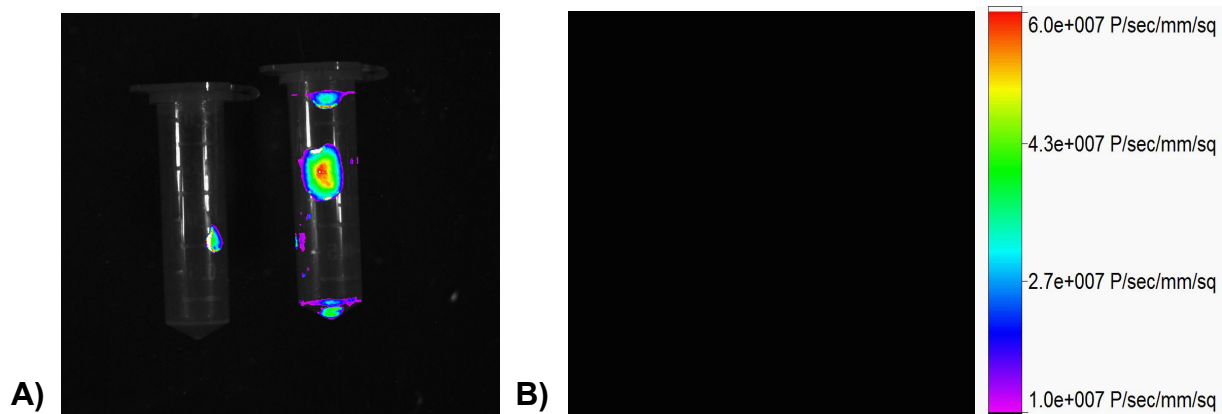


Fig. 12 Fluorescencia en orina. La imagen **A)** son dos imágenes superpuestas de fluorescencia y fotografía en blanco y negro donde se muestran dos tubos donde se recolectó la orina de dos ratones a las 6 horas de la inyección con Alexa Fluor 790, el de la derecha con vía I.V. y el de la izquierda con vía I.P. La imagen **B)** muestra únicamente la imagen de fluorescencia donde se encuentra dos tubos con orina de dos ratones a las 6 horas de la inyección con $F(ab')_2$ (I.V., I.P.).

Por otra parte, las muestras de piel y peritoneo de dos hembras inyectadas con $F(ab')_2$ por vía I.P. presentaron también fluorescencia significativa. Las muestras de piel y peritoneo de los ratones macho inyectados por vía I.P. no se obtuvieron y tampoco de los ratones inyectados por vía I.V.

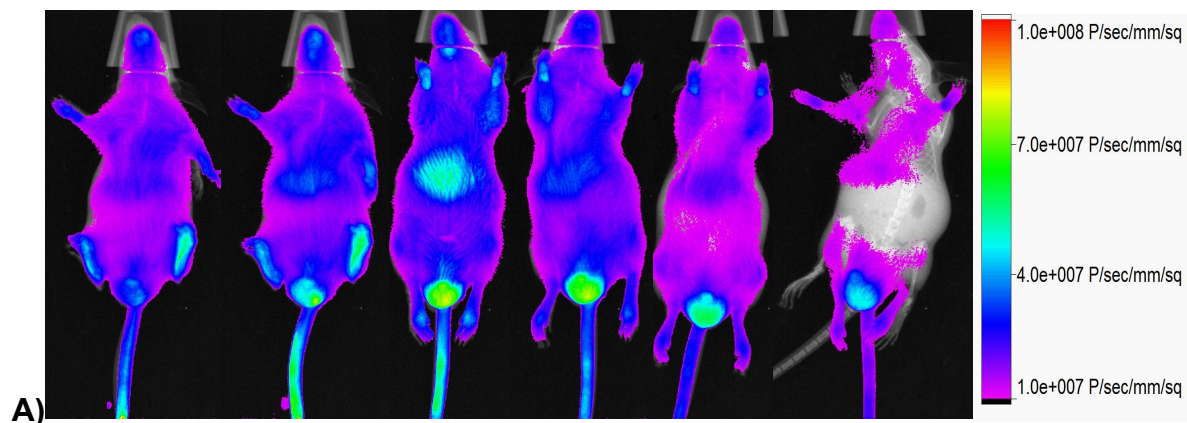
Una de las hembras inyectadas con Alexa Fluor 790 por vía I.P. presentó fluorescencia significativa en nodos linfáticos axilares y poplíteos, mientras que los nodos linfáticos de ratones inyectados con $F(ab')_2$ presentaron baja fluorescencia, (cerca al ruido de fondo de la imagen).

4.4 Dinámica general de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 por vía I.V. e I.P.

Las imágenes de distribución global con inyección I.V. (Fig. 13 y Fig. 14) indican cualitativamente dónde se distribuye $F(ab')_2$. Se puede observar que el sitio de inyección (la cola del ratón) siempre presenta fluorescencia, pero con esta vía de administración, la distribución en todo el cuerpo sucede rápidamente, es decir a las 0 h de la administración. Se puede observar en las vista ventrales (Fig. 13A y 14A) que a las 6 h hay mayor intensidad de fluorescencia en la zona donde podría encontrarse el hígado y en general en todas las imágenes ventrales y desde el

inicio, se observa mayor intensidad de fluorescencia en los órganos sexuales (con respecto a otras partes del cuerpo) tanto en machos como en hembras. En las imágenes dorsales (Fig. 13B y 14B) se observan dos focos de fluorescencia que podrían indicar fluorescencia en los riñones. También resalta la fluorescencia en regiones como las patas, hocico y orejas donde hay irrigación de vasos sanguíneos y constante estimulación del flujo por el comportamiento del ratón (estimulación con las patas en el hocico y orejas). A pesar de ser diferentes dosis inyectadas, en todos los ratones con vía de administración I.V. se observa el máximo de fluorescencia a las 6 h y una disminución notoria a las 72 h. La fluorescencia global también puede deberse a la distribución en la piel. Las repeticiones de los experimentos con vía I.V. se muestran en las figuras del apéndice A5 y A6.

Inyecciones I.V.



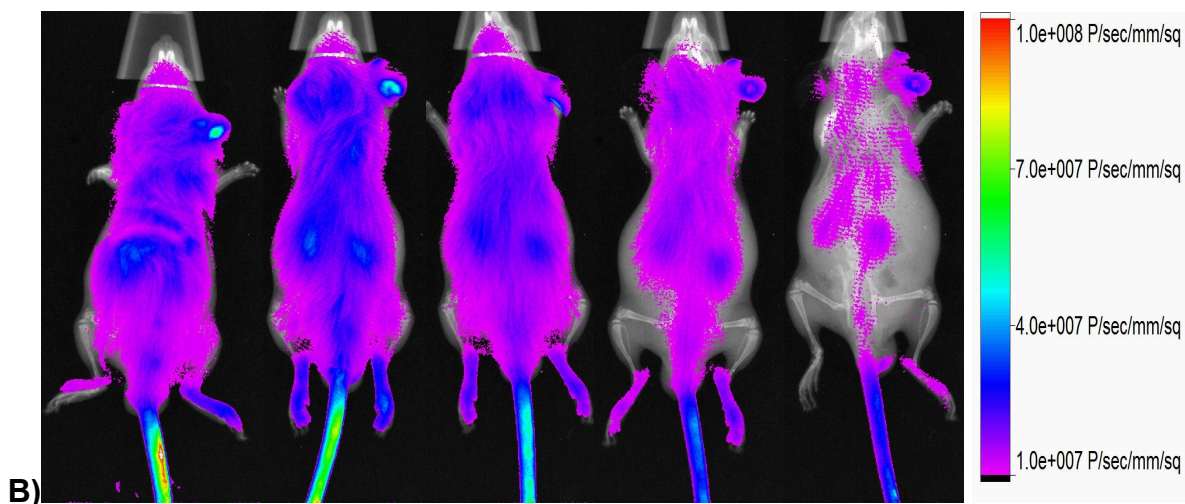
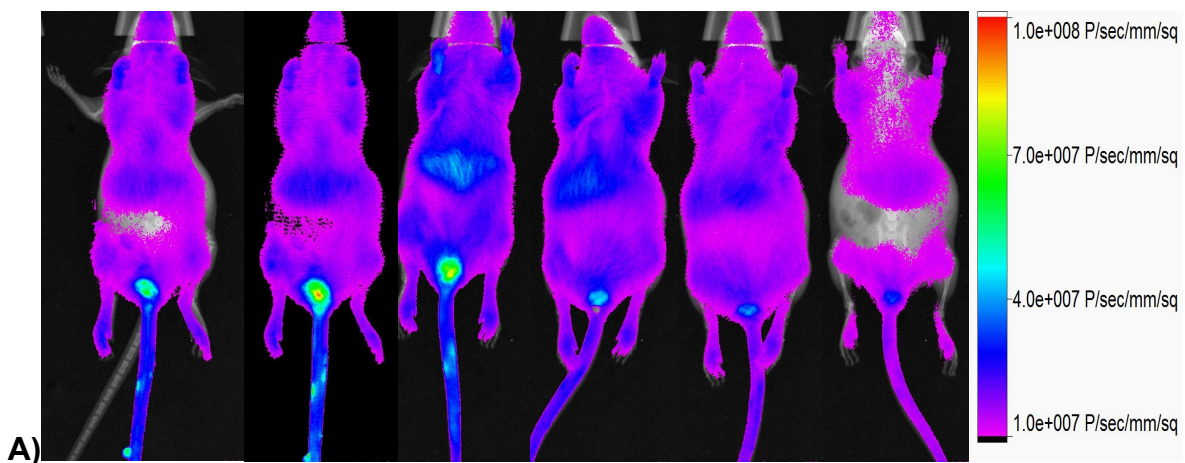


Fig. 13 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V. en ratón macho. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.V. de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 (0.29 mg en 350 μ l) y DOL= 0.87. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.



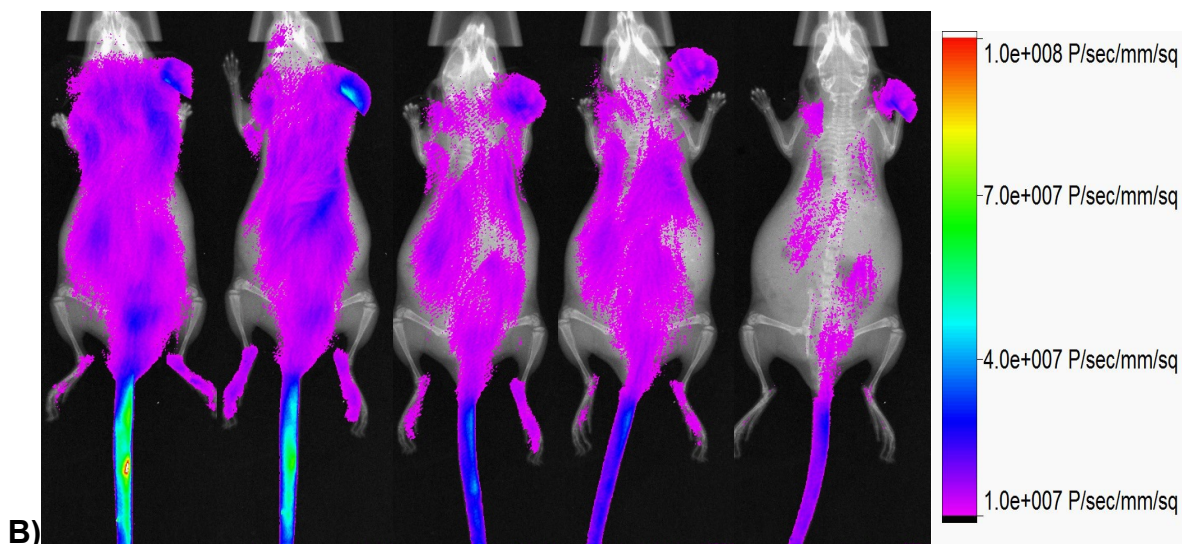


Fig. 14 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V. en ratón hembra. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.V. de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 (0.14 mg en 200 μ l) y DOL= 0.74. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.

La distribución global de $F(ab')_2$ con vía I.P. (Fig. 15 y Fig. 16) muestra una distribución donde inicialmente resalta la fluorescencia del sitio de inyección. Por otra parte, también resalta que en la imagen de las 0 h de la inyección y en las siguientes, también se observa la intensidad de fluorescencia mayor en la zona del aparato reproductor tanto en machos como en hembras. La distribución de $F(ab')_2$ nunca alcanza a ser completa (en todo el cuerpo), ya que a las 72 h se ve la disminución de la fluorescencia global. Las repeticiones de los experimentos con vía I.P. se muestran en las figuras del apéndice A7 y A8.

Inyecciones I.P.

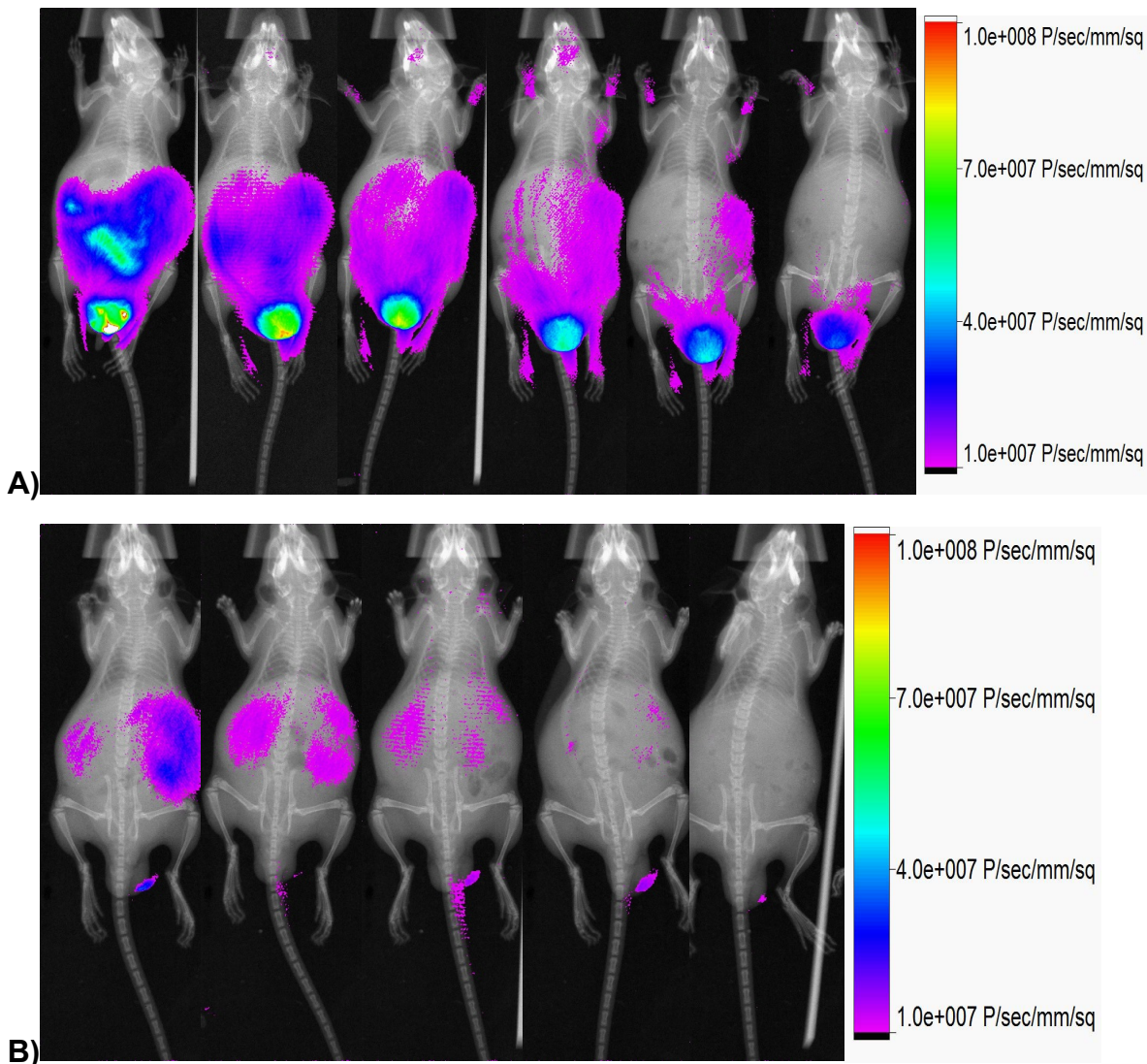


Fig. 15 Distribución global de F(ab')₂, vía I.P., en ratón macho. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.P. de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790 (0.2 mg en 210 µl) y DOL= 0.6. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.

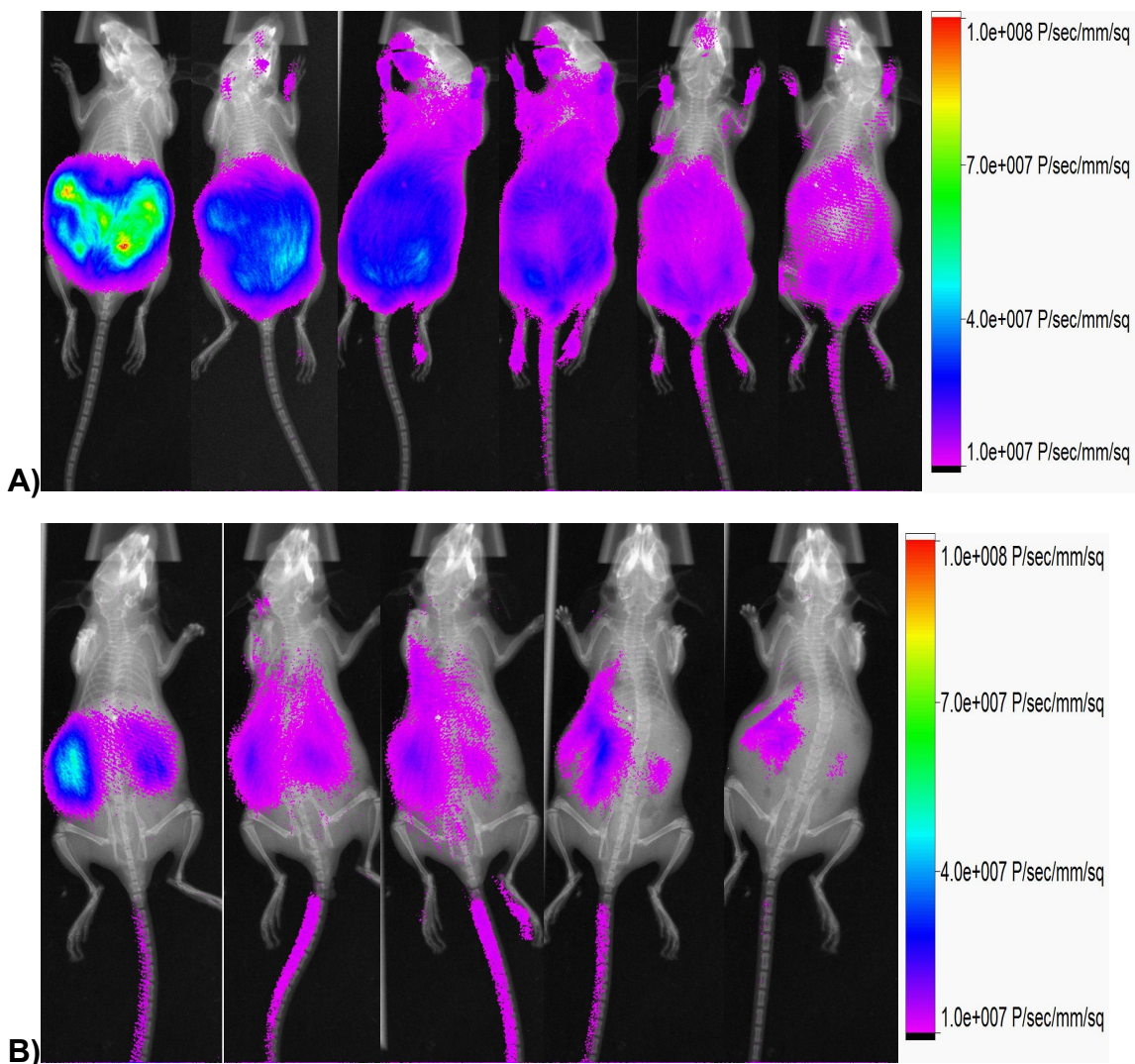


Fig. 16 Distribución global de F(ab')₂, vía I.P., en ratón hembra. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.P. de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790 (0.2 mg en 210 μ l) y DOL= 0.6. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.

4.5 Dinámica general de Alexa Fluor 790 con vía I.V. e I.P.

La distribución global con vía I.V. de Alexa Fluor 790 libre se muestra en las Fig. 17 y Fig. 18. Se observa una marcada fluorescencia en el sitio de inyección y una menor distribución que con los fragmentos $F(ab')_2$. También, la eliminación del fluoróforo libre ocurre más rápidamente, ya que prácticamente a las 24 h deja de aparecer señal. Por otra parte, con la inyección I.P. se percibe una distribución más amplia (Fig. 19 y Fig. 20), aunque esto podría deberse a la diferencia de la cantidad de fluoróforo inyectado. Por ambas vías de administración, se observa fluorescencia en el aparato reproductor, independientemente del género.

Inyecciones I.V.

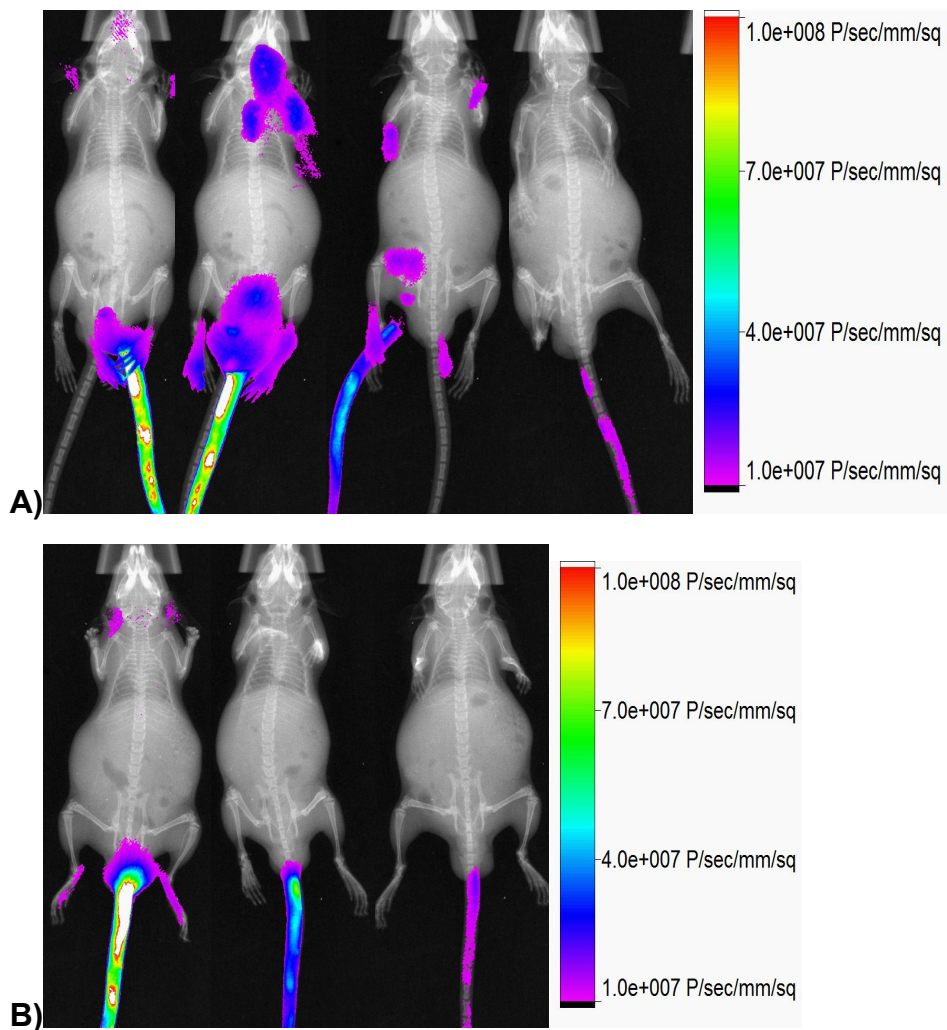


Fig. 17 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.V., en ratón macho. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.V. de Alexa Fluor 790. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección.

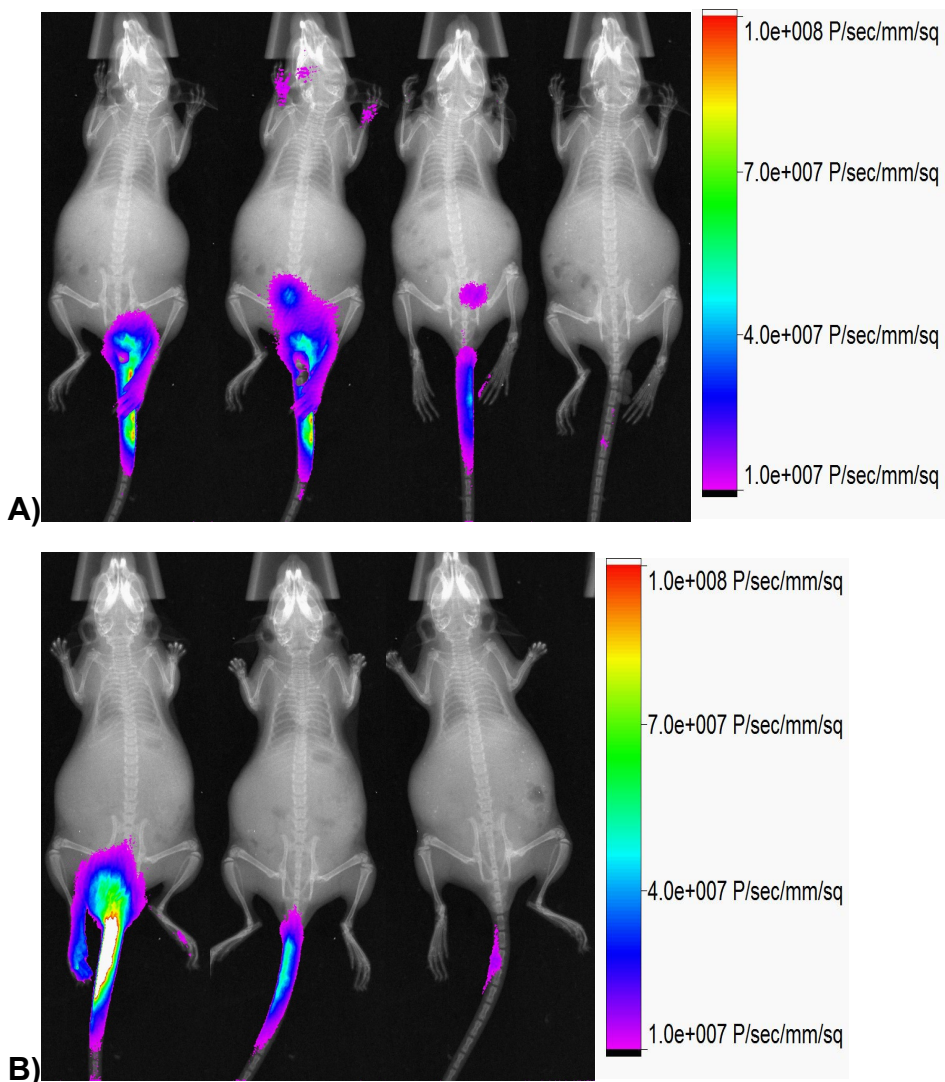


Fig. 18 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.V., en ratón hembra. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.V. de Alexa Fluor 790. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección.

Inyecciones I.P.

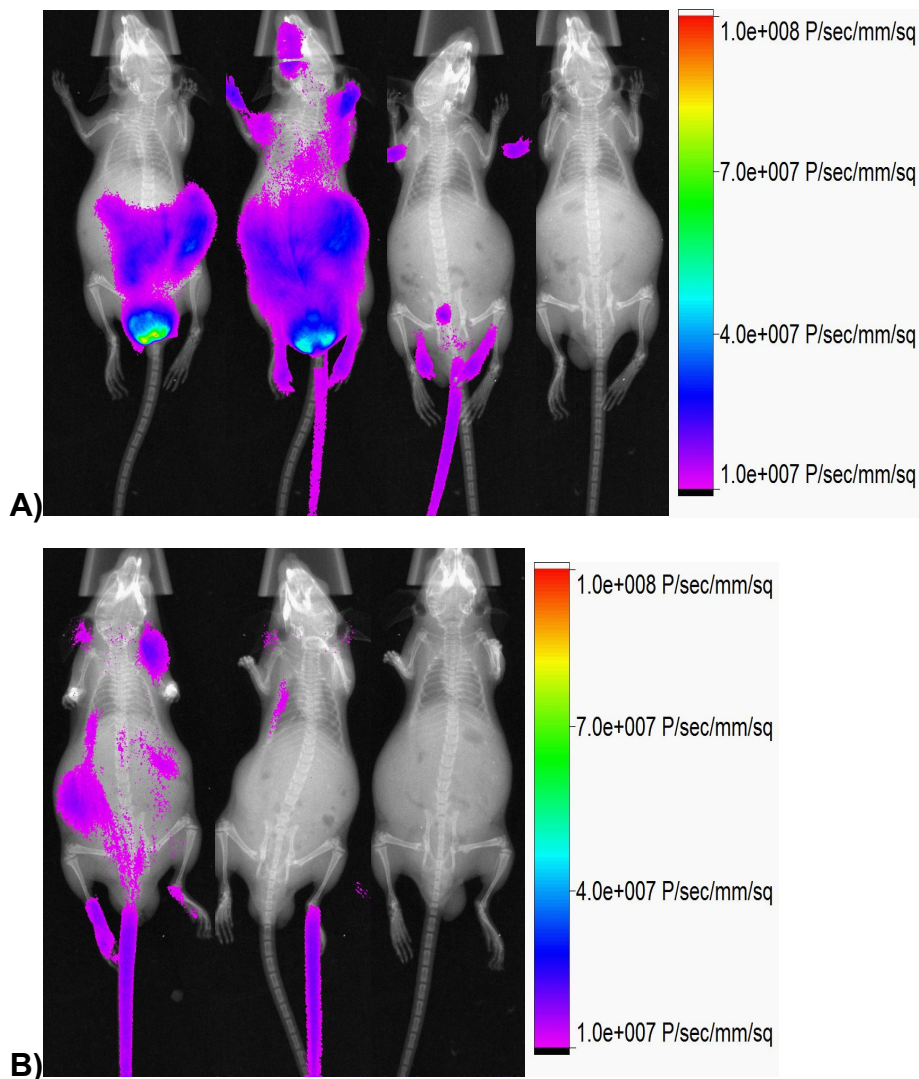


Fig. 19 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.P., en ratón macho. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.P. de Alexa Fluor 790. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección.

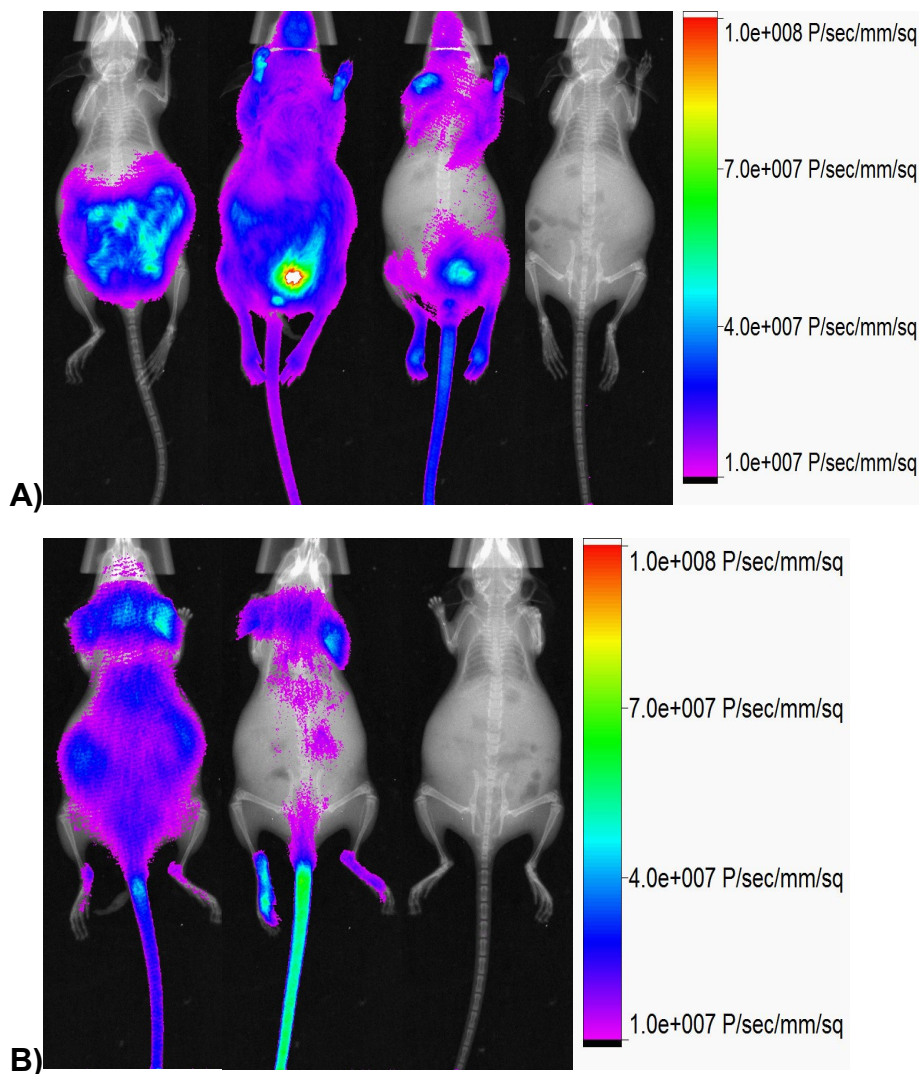


Fig. 20 Distribución global de Alexa Fluor 790, vía I.P., ratón hembra. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.P. de Alexa Fluor 790. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h y 24 h después de la inyección.

5. DISCUSIÓN

Al analizar la factibilidad de obtener datos farmacocinéticos por medio del análisis de las imágenes producidas por el sistema “In Vivo Xtreme Bruker”, se encontraron limitantes para hacer el análisis. El sistema utilizado permite observar la fluorescencia del volumen más cercano a la lámpara de los rayos de excitación del fluoróforo, mas el volumen completo del ratón fue imposible de analizar. En las imágenes de distribución global, se muestran las vistas ventral y dorsal de cada ratón, donde se observa que se detectan diferentes regiones de fluorescencia con cada vista, lo cual indica que puede haber fluorescencia en otras secciones del ratón que no se estén detectando por el equipo. En la vista ventral se detecta fluorescencia en la región donde se encontraría el hígado, en el aparato reproductor, patas y hocico, mientras que en la vista dorsal se observan dos focos de fluorescencia que podrían ser los riñones y que no se detectan en la vista ventral. Además, el análisis que se esperaba realizar de las imágenes globales no se pudo realizar consistentemente ya que el área de análisis variaba con respecto a los ligeros cambios en el tamaño del ratón y con el cambio de posición de cada ratón durante las horas del experimento.

Por otra parte, es claro que la concentración de fragmentos $F(ab')_2$ con vía de administración I.V. o I.P. fue mayormente en hígado y riñones, seguido del aparato reproductor, mientras que para los ratones inyectados con Alexa Fluor 790 sólo se detectó fluorescencia en los riñones. El detectar fluorescencia en la orina de los ratones inyectados con el fluoróforo afirma que Alexa Fluor 790 es eliminado por

esta vía, además de que ocurre más rápidamente que con los fragmentos $F(ab')_2$. Los ratones con Alexa Fluor 790 fueron sacrificados a las 24 h de la inyección y los riñones presentaron baja fluorescencia a comparación de los órganos de los ratones inyectados con $F(ab')_2$, mientras que la mayoría de los ratones inyectados con $F(ab')_2$ fueron sacrificados a las 72 h de la inyección.

Con respecto al papel del sistema linfático en la distribución del $F(ab')_2$, los nodos linfáticos axilares y poplíteos sólo fueron recolectados de 4 de los ratones inyectados con $F(ab')_2$ (por falta de sistematización al realizar los experimentos). Estos presentaron baja fluorescencia (cercana al ruido de fondo de las imágenes). Se sabe que el sistema linfático está implicado en la distribución de antivenenos y venenos (Vergara I. et al., 2016), así que la falta de señal en los nodos puede deberse al tiempo del sacrificio de los ratones, ya que el sistema linfático podría estar implicado en la distribución pero no en la acumulación de los fragmentos $F(ab')_2$. En uno de los ratones inyectados I.P. con Alexa Fluor 790 se presentó fluorescencia significativa, mientras que en los otros 3 ratones que se trataron con el fluoróforo no se encontró tal fluorescencia.

La piel y peritoneo tampoco se colectaron de todos los ratones ya que fue una propuesta posterior a varios de los experimentos realizados. Sin embargo, en las muestras que se recolectaron se logró detectar fluorescencia significativa en los ratones administrados con $F(ab')_2$ y administrados con Alexa Fluor 790. Esto puede deberse a que tanto en piel como en peritoneo, hay células del sistema fagocítico mononuclear o sistema retículo endotelial (sistema inmunológico) que

podrían estar implicadas en la degradación de los fragmentos $F(ab')_2$. De igual manera, esto podría explicar la acumulación de $F(ab')_2$ en hígado, patas y hocico, ya que este sistema se encuentra en la mayoría de los órganos de un organismo, tanto en tejido conjuntivo como en órganos implicados en el metabolismo de fármacos como el hígado. Por otra parte, la fluorescencia en la región de los órganos reproductores tanto en hembras como en machos puede deberse a abundante irrigación de la zona. Para poder deducir con más exactitud cuál es el papel de cada uno de los órganos en los que se presentó fluorescencia, se podría realizar el análisis de cortes de estos órganos y analizarlos con un microscopio confocal.

6. CONCLUSIONES

No hay diferencias en la distribución de $F(ab')_2$ a nivel de órganos entre machos y hembras por ninguna vía de administración (I.V. o I.P.).

La eliminación y distribución del fluoróforo libre fue diferente a la de los fragmentos $F(ab')_2$, lo cual indica que los fragmentos $F(ab')_2$ marcados con el fluoróforo se mantuvieron estables durante el experimento.

Los fragmentos $F(ab')_2$ se acumulan en riñón pero no se eliminan por orina, mientras que el fluoróforo libre se acumula en riñón pero sí es eliminado por orina. El comportamiento del fluoróforo libre tiene una distribución y eliminación

esperada, ya que es una molécula pequeña (1.75 kDa) a comparación de F(ab')₂ (100 kDa).

Por otra parte, la distribución global fue diferente con las vías I.V. e I.P. debido principalmente a la acumulación de la fluorescencia del sitio de inyección. Sin embargo, la distribución a nivel órganos fue la misma, independientemente de la vía de administración y del género del ratón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batra, S.K.; Jain, M.; Wittel, U.A.; Chauhan, S.C.; Colcher, D. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Elsevier Science* 2002, 13: 603-608.
- Bénard, M.; Neri, E.E.; Fry, B.G.; Boyer, L.; Cochran, C.; Alam, M.; Jackson, T.N.W.; Paniagua, D.; Olvera, F.; Koludarov, I.; Sunagar, K.; Alagón, A. (2015). Antivenom Research and Development., in Fry, B.G. (ed.) *Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Oxford University Press: Capítulo 3, PP. 61-72.
- Chippaux, J.P.; Alagón, A. Envenimations et Empoisonnements par les Animaux ou Vénéneux VII: L'aracnisme du Nouveau Monde. *Venin Trop* 2008, 68: 215-221.
- Chippaux, J.P. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design, Development and Therapy* 2012, Vol: Pg.

- Gutierrez, J.M.; Leon, G.; Lomonte, B. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clin Pharmacokinet* 2003, 42 (8): 721-741.
- Hammoudi-Triki, D.; Lefort, J.; Rougeot, C.; Robbe-Vincent, A.; Bon, C.; Laraba-Djebari, F.; Choumet, V. Toxicokinetic and Toxicodynamic Analyses of *Androctonus Australis Hector* Venom in Rats: Optimization of Antivenom Therapy. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007, 218. 205-214.
- Harrell, M.I.; Iritani, B.M.; Ruddell, A. Lymph Node Mapping in the Mouse. *National Institute of Health*. 2008, 332(1-2): 170–174.
- Ismail, M.; Abd-Elsalam, M.A.; Al-Ahaidib, M.A. Pharmacokinetics of I-Labelled *Walterinnesia Aegyptia* Venom and its Specific Antivenins: Flash Absorption and Distribution of the Venom and its Toxins Versus Slow Absorption and Distribution of IgG, F(ab')₂ and F(ab) of the Antivenin. *Toxicon*. 1997, 36(1): 93-114.
- Lobo, E.D.; Hansen, R.J.; Balthasar, J.P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 93: 2645–2668.
- Oie, S. Drug distribution and binding. *Clin Pharmacol*. 1986, 26(8):583-6.
- Paniagua, D; Vergara, I; Román, R; Romero, C; Benard-Valle, M; Calderón, A; Jiménez, L; Bernas, M.J; Witte, M.H; Boyer, L.V; Alagón, A. Antivenom

Effect on Lymphatic Absorption and Pharmacokinetics of Coral Snake Venom Using a Large Animal Model. *Clin Toxicol (Phila)*. 2019, 57 (8): 727-734.

- Pavlinkova, G.; Colcher, D.; Booth, B.J.M.; Goel, A.; Batra, S.K. Pharmacokinetics and Biodistribution of a Light-chain-shuffled CC49 Single-chain Fv Antibody Construct. *Cancer Immunol Immunother*. 2000, 49: 267-275.
- Rivière, G.; Choumet, V.; Audebert, F.; Sabouraud, A.; Debray, M.; Scherrmann, J.M.; Bon, C. Effect of Antivenom on Venom Pharmacokinetics in Experimentally Envenomed Rabbits: Toward an Optimization of Antivenom Therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997, 281(1-8).
- Rojko, J.L.; Schiavi, S.P. Physiologic IgG Biodistribution, Transport, and Clearance: Implications for Monoclonal Antibody Products. 2007, Capítulo 11.
- Rowland, M. Influence of Route of Administration on Drug Availability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1972, 61(1): 70-74.
- Smith, D.A.; Beaumont, K.; Maurer, T.S.; Di, L. Volume of Distribution in Drug Design. *Med. Chem*. 2015, 13;58(15):5691-8.
- Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A. Volumes of distribution. *Vet. Pharmacol*. 2004, 27(6):441-53.

- Vergara, I. (2010). *Influencia de la Vía de Administración en la Capacidad Neutralizante in vivo de dos Antivenenos*. (Tesis de maestría). Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca Morelos, México.
- Vergara, I.; Castillo, E.Y.; Romero-Piña, M.E.; Torres-Viquez, I.; Paniagua, D.; Boyer, L.V.; Alagón, A.; Medina, L.A. Biodistribution and Lymphatic Tracking of the Main Neurotoxin of *Micrurus fulvius* Venom by Molecular Imaging. *Toxins* 2016, 8, 85.

APÉNDICE

Distribución de $F(ab')_2$ en órganos, gráficos individuales de cada ratón.

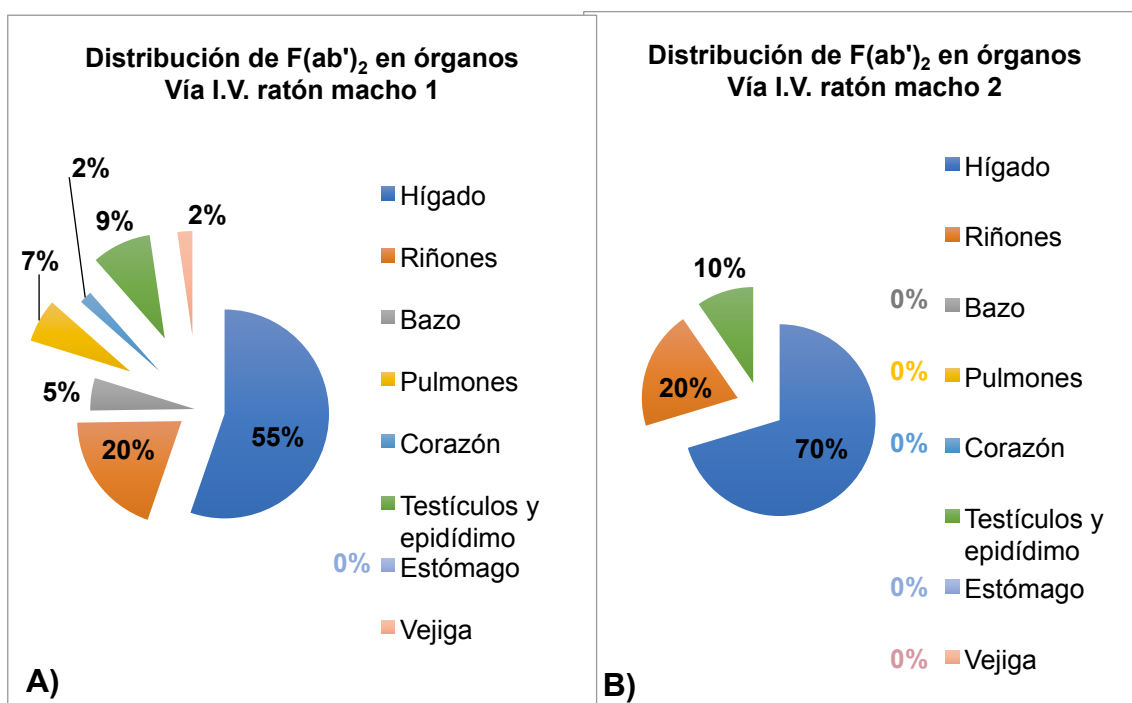


Fig. A1 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de ratones macho, vía I.V. La gráfica **A)** muestra la distribución de la fluorescencia en los órganos del ratón macho 1 (inyección con 0.29 mg de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790). En la gráfica **B)** se muestra lo mismo que en la **A)** pero en el ratón macho 2 inyectado con 0.21 mg de $F(ab')_2$ marcados

con Alexa Fluor 790. Es notorio que la fluorescencia está más distribuida en distintos órganos en el ratón de la figura **A**), pero es necesario aclarar que del ratón de la figura **B**) no se obtuvieron la mayoría de los órganos para el análisis, como se indica en la **Tabla 1**.

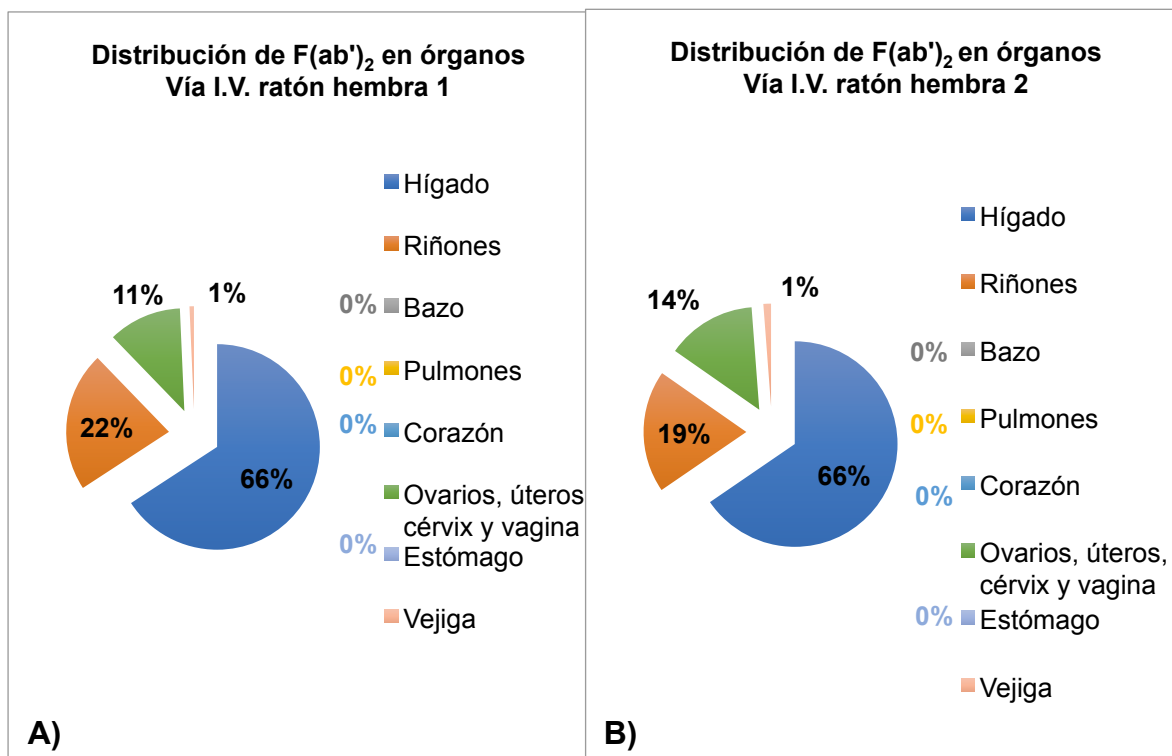


Fig. A2 Distribución de F(ab')₂ en órganos de ratones hembra, vía I.V. La gráfica **A**) muestra la distribución de la fluorescencia en los órganos del ratón hembra 1 (inyección con 0.14 mg de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790). En gráfica **B**) se muestra lo mismo que en la **A**) pero con el ratón hembra 2 al cual se le administró la misma cantidad (0.14 mg de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790).

Fig. A3 Distribución de F(ab')₂ en órganos de ratones macho, vía I.P. La gráfica **A**) muestra la distribución de la fluorescencia en los órganos del ratón macho 1 (inyección con 0.20 mg de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790). En gráfica **B**) se muestra lo mismo que en la **A**) pero con el ratón macho 2 al cual se le administró 0.10 mg de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790.

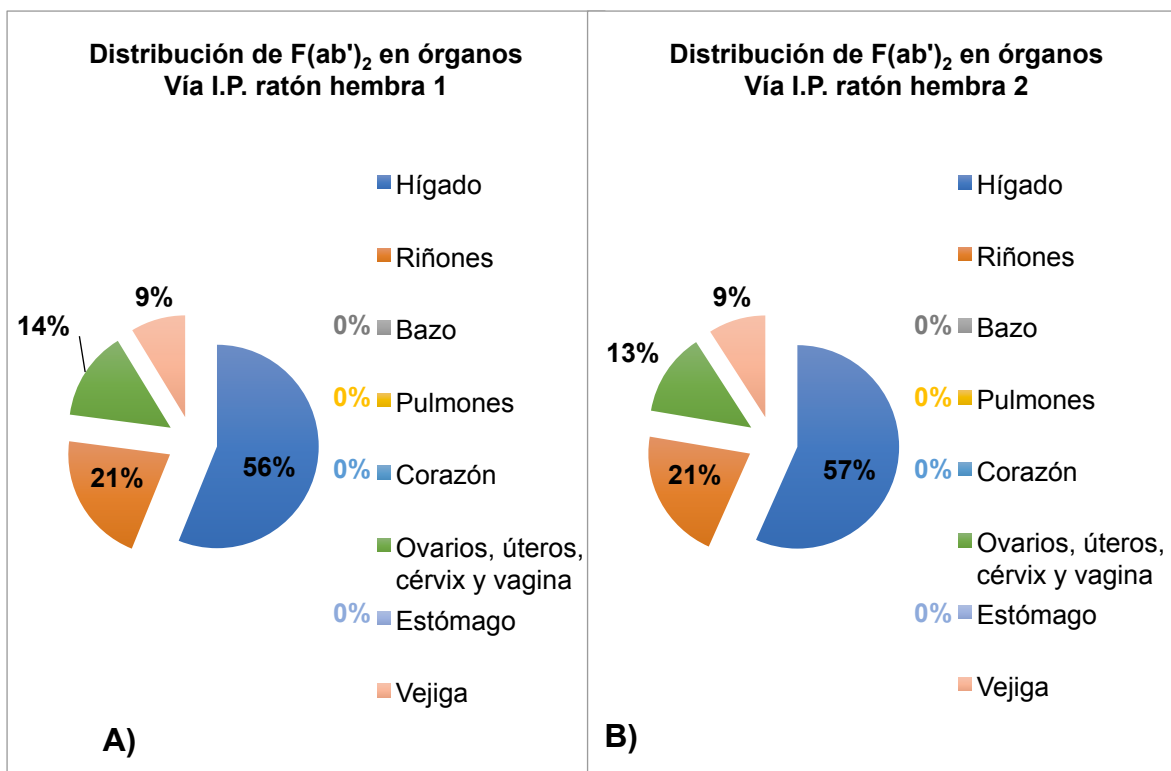


Fig. A4 Distribución de $F(ab')_2$ en órganos de ratones hembra, vía I.P. La gráfica **A)** muestra la distribución de la fluorescencia en los órganos del ratón hembra 1 (inyección con 0.20 mg de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790). En gráfica **B)** se muestra lo mismo que en la **A)** pero con el ratón hembra 2 al cual se le administró la misma cantidad (0.20 mg de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790).

Dinámica general de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 con vía I.V.

e I.P.

Inyecciones I.V.

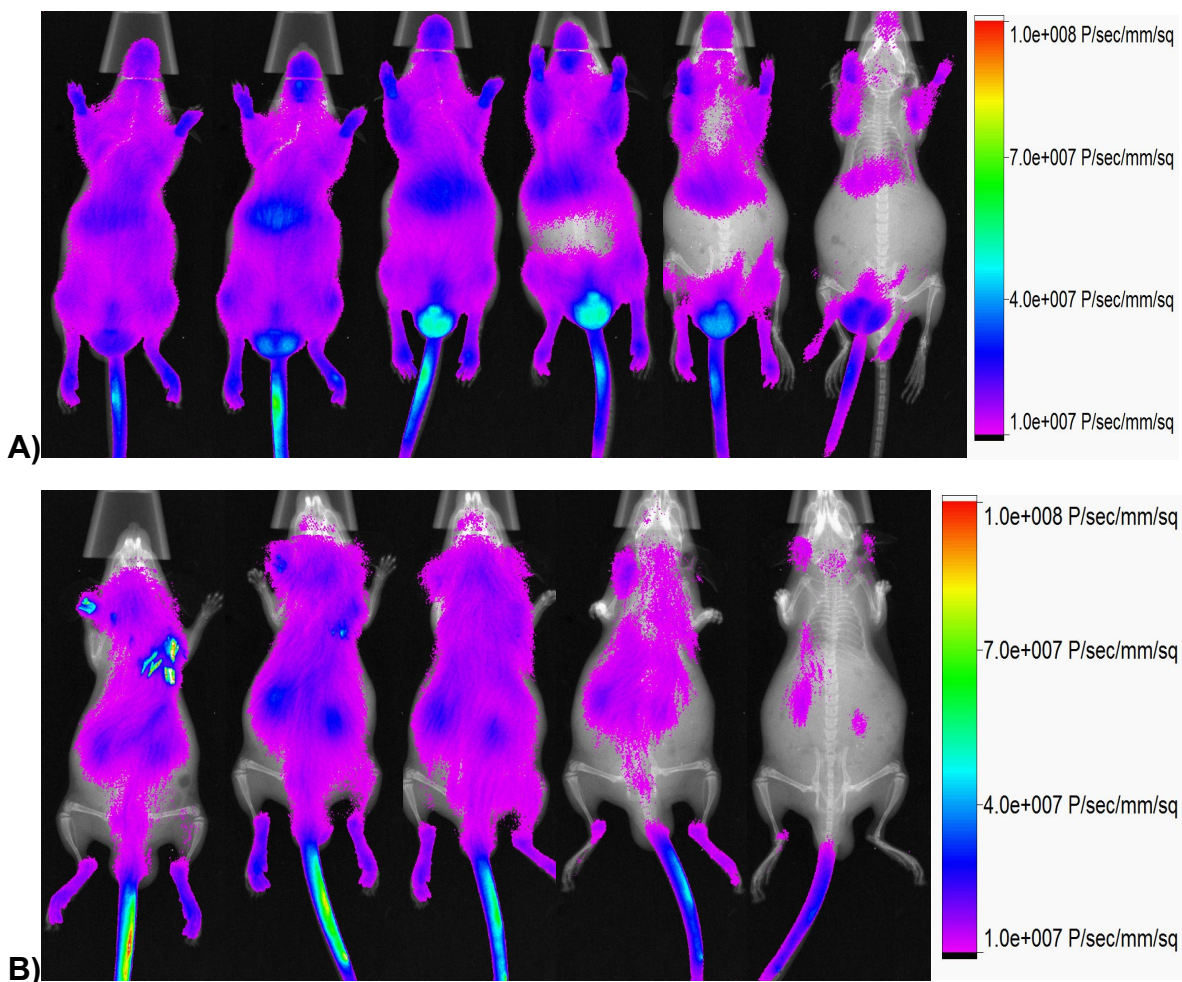


Fig. A5 Distribución global de F(ab')₂, vía I.V., en ratón macho. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.V. de F(ab')₂ marcados con Alexa Fluor 790 (0.21 mg en 250 µl) y DOL= 0.87. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.

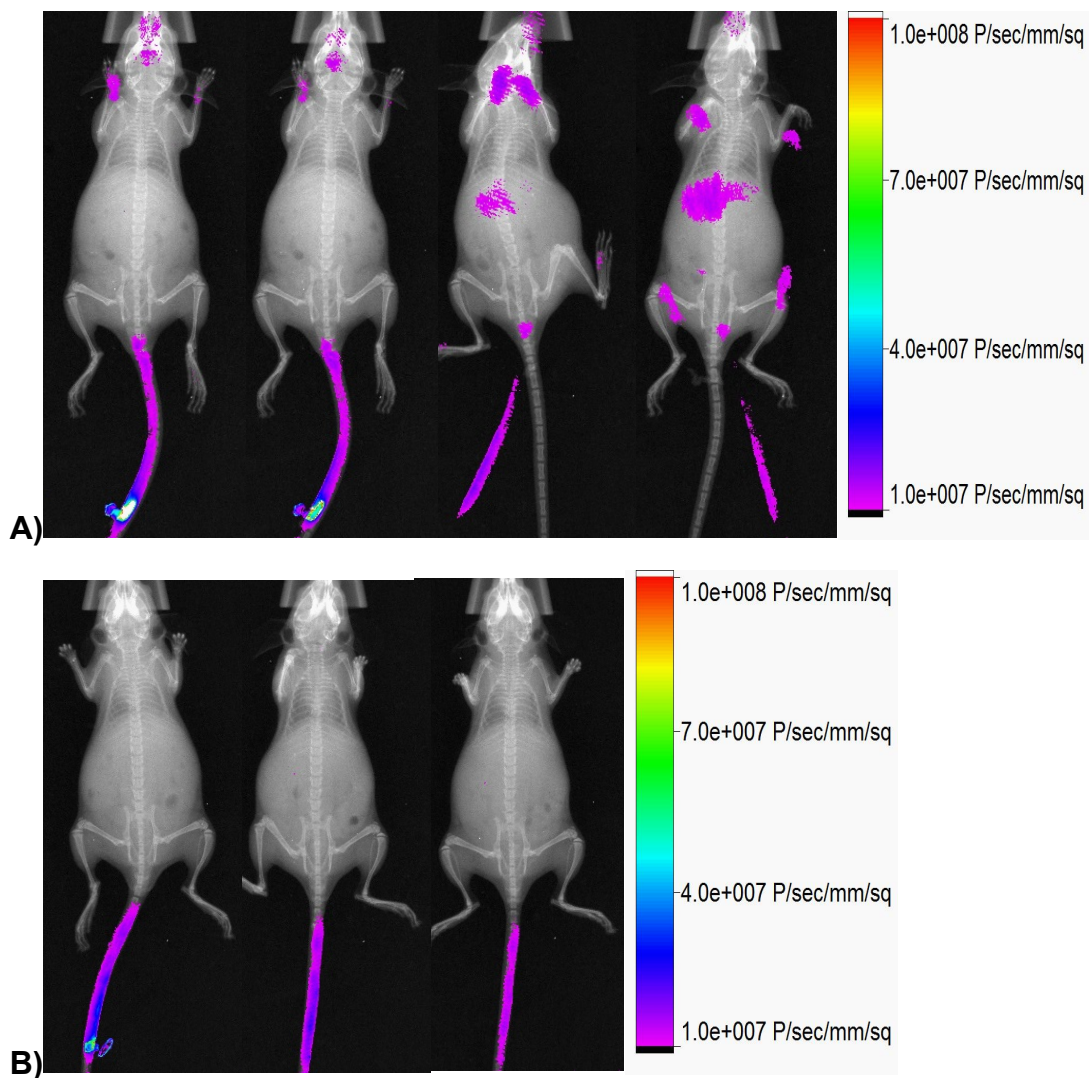


Fig. A6 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.V., en ratón hembra. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.V. de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 (0.14 mg en 200 μ l) y DOL= 0.74. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h después de la inyección.

Inyecciones I.P.

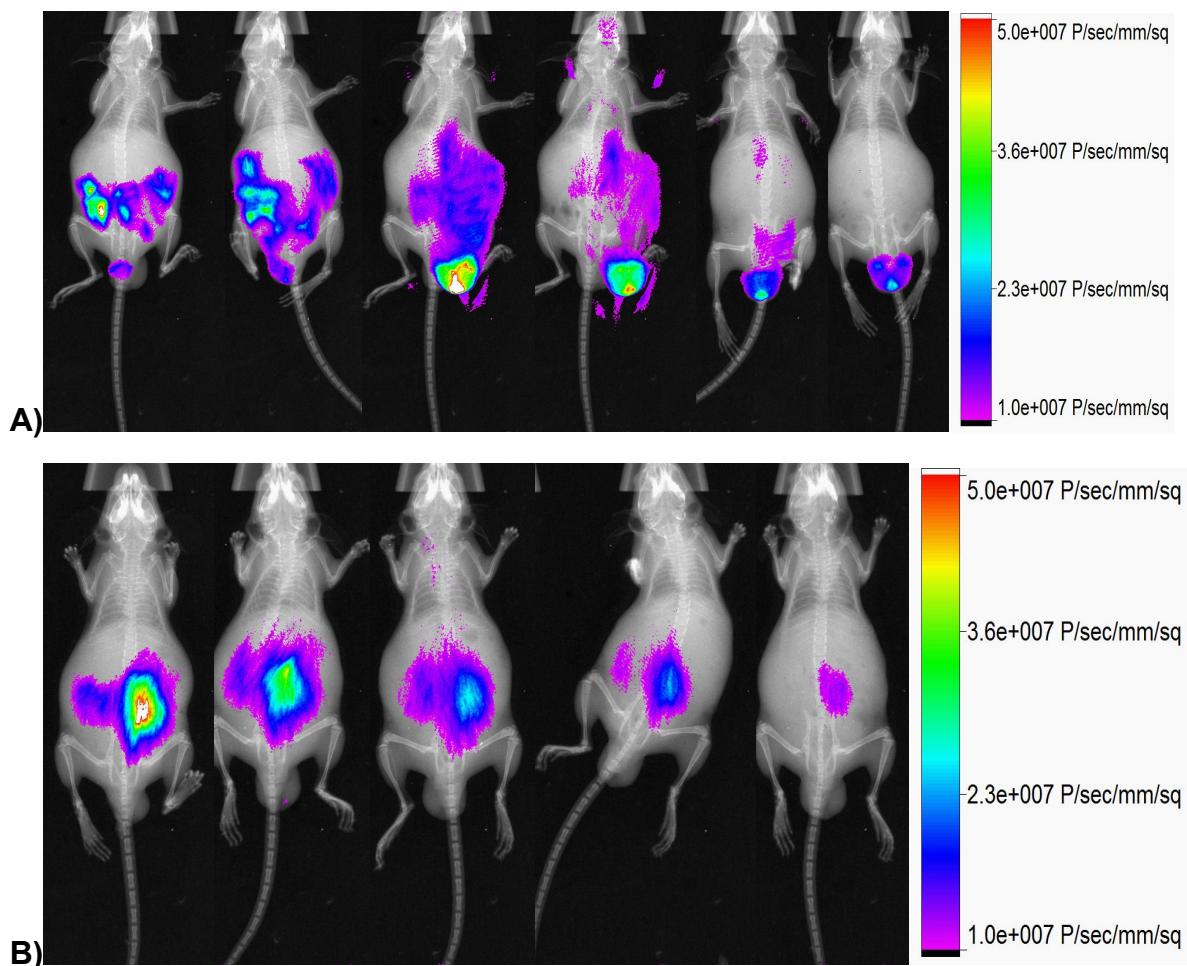


Fig. A7 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.P., ratón macho. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.P. de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 (0.1 mg en 250 μ l) y DOL= 0.62. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.

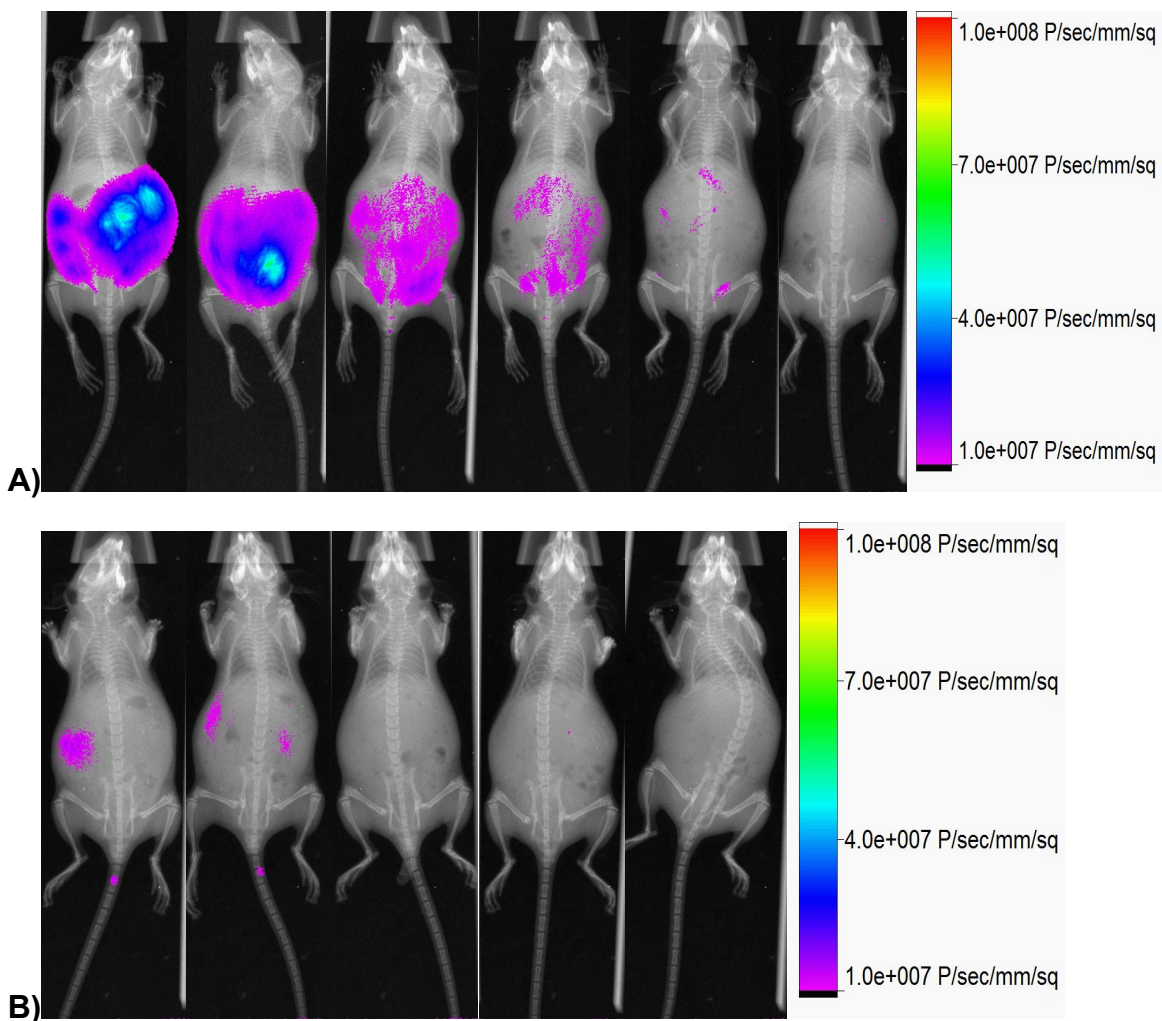


Fig. A8 Distribución global de $F(ab')_2$, vía I.P., en ratón hembra. Imágenes de fluorescencia y rayos X superpuestas mostrando la dinámica general con inyección I.P. de $F(ab')_2$ marcados con Alexa Fluor 790 (0.2 mg en 210 μ l) y DOL= 0.6. **A)** Vista ventral, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: primeros segundos, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección. **B)** Vista dorsal, cada una de las imágenes tomadas en los siguientes tiempos: 1 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. CORKIDI ZAJUR TANIA con número de matrícula 201**54002385** cuyo título es:

BIODISTRIBUCIÓN DE FRAGMENTOS DE INMUNOGLOBULINAS TIPO F(ab)[']₂ EN RATONES, POR ANÁLISIS DE IMÁGENES

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular.

Cuernavaca, Mor a 12 de octubre del 2020

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. **CARMEN NINA PASTOR COLÓN**
DRA. **VERONICA NARVAEZ PADILLA**
DR. **ALEJANDRO ALAGÓN CAÑO**
DRA. **ANGELICA SANTANA CALDERÓN**
DR. **IVAN MARTINEZ-DUNCKER RAMIREZ**

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2020-10-20 12:52:19 | Firmante

chPR+L2Sj4PLfXL3Fi42ImO9GIuz1rICEYAZ9zjHZNgsuAMzqYDVeUJ5ab14jsH4db9WRF1s3P81JGpY7kY6Ob2I4ixySLOGL8r6HQvo/hdpgli9SbRuq6jAtJhRiU6vZl0gFXFYQv0/bKoGiRyGrYQpwKZSQY+knECa7czRDs27q1wqIBG46np4BwtsMQi/2jAtCJ14L8g3Wp52r27kvc9468uBViE/i5F7AoccrXt9m9DTm0oxXPeo2JkOyE9fDKjCy72QL/P39D9jq3E/ExqgUwMHXfL+Yd8NgPru1jFy7Gdg7gRb2fC4FBENS/3pLEJvRk2YiUHDw8hw==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2020-10-20 13:03:30 | Firmante

FWjzOXd3NKCm4ZQZ7PczwWB29yBuh/iLoR2K7fPmxbm84slvDPPjkfXzVej9Sa/5q/p5f/2e8BatqbVPG+ijE6sGc3F7oAneE9YKSF7tybWY/u+KltaeU0UlfEv95L8/Po5TQ6K80ig07+dsae8APHNrqLrnke7k/JhCes4W3BKnfGepSvT0vI5Mqg9OLLydc7kdcMHIXf5jsTRA3WCxGRam+TDeu18Am6YKfTeoo/gm537iJydEEcfEx+xDbofnYyAhu+fjaNA2xT0+KTbp0LHOAr3YJect1kv0wB+lyYNF1D1vln2Liudcme1ZEDtFZBWKPyPELUekgFBsRw==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-10-20 14:57:41 | Firmante

EVVz1TCti0eQHUstO8wBGldvBUq2Mb1W+y7AkFWnOFauLr578Gd5GMM/5yaykbWmkZvQJIAM0lgPzvUaEtluzhhjn+IWspChyy1AOEf/vZJAUxtlZHuyXMxWo5Bthq8JNNBXHmTfzN/mHH8JU5dk8t7yzkpcww1ho0Bblk+yRYbnlsexnJSAV1vu1UVJQALZD24IH5daMmEXs7oaE24eYUIZQ1KTSAGGkW1pRy9z8O3IGEbh9xM4Y/UwVUtkSzi4RCSbXyVr2XoChGCrBnro1Lo/X4N0dOaibKLUeitarW9m8baya+AmPpQ0G9fCFIBw3rBdawxKkR3ccTE397uA==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2020-10-23 14:11:34 | Firmante

DRkD17GHM+AE7QUldGtHEQIKm4ZOQTUNip5jeUTib6BWarWYhQJan3xgaKcWxveA7py4qpg0qRiiev6ph0gInwpsvKP53WnFpdNKRfW0vZ92z8ODP5XxpHZWce1rH4Vz/VmxfPre0RYbiMHTTZOjeYt+RJNnlUNz4JgVAzS+xYhyVi/kd4uT7i+J80yOUtlwb6NbwuD34Wd+FLrj9mwvQL3b4fo8lvJUXI8ZgJeuduXBAIvbfno2ioAcadabaBw5xc2Lz81loGjB0mGj7yd4iw3hB+8P+Gn/6GZyNbvichTEf3WYfzaCH8YUza4omFieZ+3ndx0XnmKCu+y9J4A==

ALEJANDRO ALAGÓN CANO | Fecha:2020-11-10 21:45:56 | Firmante

bZRy17tm6ASLSuMYfA6NwcqoCSKw7dipnqnawla96Cqj6kE8Y1Zuz/yBbfnFuvvW32LmHBp/vinP77iYn8CBS23xmk3Sdq+gilwrh6H7IFG1wsQW9cCvqRP1rZbOmgFT4wDIA1T1btBdF6nNm3/LfArAkV1Xcyes0AHpSi1/HzPuQaz5n4zJD3e4MuboYRfjw5HgSEF2NgOZ9DwEbLHUGNqhtX4r5g8YlqXYasXO/GIOKJADAJolXsT6J0U5UfyzgERFEakZ9frkDP/PibIHkMqHfexqXNOS68nu6piFh8uJYpyC7puFFSm8JcBJweH4hkXt6qA5+LbcnpzfA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



tKeyzH

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DRJOLpEMnALK5oAkn3YdWmrzn2vR4CuA>

