

# Obtención de un antiveneno contra el veneno de *Phoneutria nigriventer* (arachnida; ctenidae)

## Obtention of an antivenom against *Phoneutria nigriventer* (arachnida; ctenidae) venom

Dr. Adolfo R. de Roodt<sup>a,b</sup>, Dr. Luis R. Gutiérrez<sup>c</sup>, Dr. Roberto Rufino Caro<sup>c</sup>, Dr. Néstor R. Lago<sup>a</sup> y Dr. José L. Montenegro<sup>c,d</sup>

### RESUMEN

Los envenenamientos por la picadura de arañas del género *Phoneutria* ("araña de los bananeros") pueden causar la muerte, especialmente en niños. El único tratamiento específico es la aplicación del antiveneno, del cual hay un solo productor mundial. En este trabajo se comunica el desarrollo de un antiveneno experimental en equinos, a fragmentos F(ab)<sub>2</sub>, contra el veneno de *Phoneutria nigriventer*. El antiveneno obtenido neutralizó el veneno de arañas de esta especie provenientes de distintas zonas de la Argentina (Misiones y Jujuy). La sinología del envenenamiento en los animales de experimentación fue totalmente inhibida. La experiencia desarrollada muestra que la producción local de este antiveneno es viable, lo que equivaldría a no depender de la adquisición de este tipo de productos del extranjero, lo que en ocasiones es imposible, pues está supeditada al excedente de stock del productor.

**Palabras clave:** antiveneno, arañas, envenenamiento, *Phoneutria*, veneno.

### SUMMARY

Envenomation by spiders of the genus *Phoneutria* ("banana spider") may be lethal, especially in children. The only available specific treatment is the use of antivenom, which is produced by only one laboratory in the world. In this study we report the development of an equine F(ab)<sub>2</sub> experimental antivenom raised against the venom of *Phoneutria nigriventer*. The antivenom neutralized the venom of spiders from different regions of Argentina (Misiones and Jujuy), the development of envenomation symptoms in experimental animals was totally inhibited. These results show that local production of this type of antivenom is possible. Independence of production is important since international acquisition is always conditioned by the availability of stock surplus from the sole producer.

**Key words:** antivenom, envenomation, *Phoneutria*, spiders, venom.

- Área Investigación y Desarrollo/Serpentario, INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Ministerio de Salud de la Nación.
- Sección Toxinopatología, Centro de Patología Experimental y Aplicada, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
- Laboratorio de Remonta y Veterinaria 601, Ejército Argentino, Campo de Mayo, San Miguel, Pcia. de Buenos Aires.
- Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Cátedra de Microbiología General e Inmunología Básica.

### Correspondencia:

Dr. Adolfo Rafael de Roodt: aderoodt@gmail.com

**Conflicto de intereses:** Ninguno que declarar.

Recibido: 1-9-10

Aceptado: 17-11-10

### INTRODUCCIÓN

Las arañas del género *Phoneutria* (*P.*) pueden producir la muerte de seres humanos, y la población más sensible es la pediátrica.<sup>1</sup> Se las denomina "armadeiras", por la posición que adoptan al sentirse amenazadas (levantan ambos pares anteriores de patas [Figuras 1 y 2]), o "araña de los bananeros", porque suelen encontrarse en sus cachos.<sup>2-5</sup> Actualmente se describen las especies *P. nigriventer*, *P. fera*, *P. boliviensis*, *P. reidy* y *P. bahiensis*. *Phoneutria nigriventer* se encuentra en Misiones, Chaco, Formosa, Salta y Jujuy, mientras que *P. fera*, es una especie brasileña que llega a encontrarse en la Argentina, principalmente en puertos y mercados de frutas,<sup>2</sup> relacionada a cargamentos ingresados por el puerto de Buenos Aires.<sup>3</sup>

Son más activas durante el período de reproducción (en los meses de marzo y abril, dependiendo de la temperatura), cuando pueden ingresar a viviendas o cruzar caminos o picadas.<sup>2</sup> Tras la cópula, las hembras se mantienen sedentarias y cuidan las ootecas; de esta forma, al disminuir la cantidad de arañas circulantes, disminuyen los accidentes.<sup>2</sup>

Su cuerpo puede superar los 3 cm y, considerando las patas, los 15 cm. No viven en telas y de día permanecen ocultas en cortezas de árboles, bajo troncos, en bananeros, palmeras o bromelias. Son cazadoras nocturnas. Pueden encontrarse en el interior de viviendas en lugares oscuros y húmedos, como dentro de roperos o calzado, atrás de muebles y cortinas, etc. Al sentirse amenazadas pueden atacar saltando hacia adelante más de 20 cm.<sup>2-4</sup>

La inoculación de veneno produce dolor inmediato y muy intenso que se irradia a partir del sitio de la picadura.<sup>5</sup> Puede haber edema, eritema, calambres dolorosos, temblores, convulsiones tónicas, parálisis espástica, sialorrea, sudoración, priapismo, taquicardia, arritmias, disnea y disturbios visuales.<sup>4-6</sup> El veneno posee péptidos que contraen la musculatura lisa e incrementan la

permeabilidad vascular al activar el sistema calicreína tisular y liberar óxido nítrico y toxinas que actúan en los canales de Na<sup>+</sup>.<sup>5-10</sup> Estas últimas modifican la activación o inactivación de canales y despolarizan tejidos excitables, como fibras musculares y terminaciones nerviosas del sistema nervioso autónomo. La liberación de neurotransmisores, por estimulación inducida o espontánea de potenciales de acción repetitivos, es la mayor causa de las contracciones musculares tónicas, incremento brusco en la tensión, enlentecimiento en la relajación y de la liberación de catecolaminas o acetilcolina en el sistema nervioso autónomo.<sup>4,8</sup>

En Brasil se clasifica a los accidentes como leves (más del 90% de los casos, con solo signos locales, si bien puede haber taquicardia o agitación,

secundarias al dolor), moderados (cerca del 8%, con taquicardia no debida al dolor, hipertensión, sudoración discreta, agitación psicomotora, visión borrosa y vómitos ocasionales) y graves (menos del 1% y casi restringidos a niños pequeños, en los que, además de los signos anteriores se observan una o más de las siguientes manifestaciones: sudoración profusa, sialorrea y vómitos).<sup>5</sup>

En la Argentina, los envenenamientos graves no son comunes,<sup>3,4</sup> pero se han registrado muertes.<sup>9</sup>

El tratamiento específico para este envenenamiento es la aplicación del antiveneno,<sup>1,5</sup> del cual solamente existe el *soro antiaracnídico* (Instituto Butantan, San Pablo, Brasil).<sup>1</sup> Por estos motivos se decidió realizar, experimentalmente, un antiveneno específico anti-*Phoneutria*.

## MATERIALES, METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Se inmunizaron equinos con veneno de *P. nigriventer*. El suero obtenido fue procesado para obtener los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fue probado en su potencia neutralizante de acuerdo a la metodología utilizada por el único productor mundial de este antiveneno.

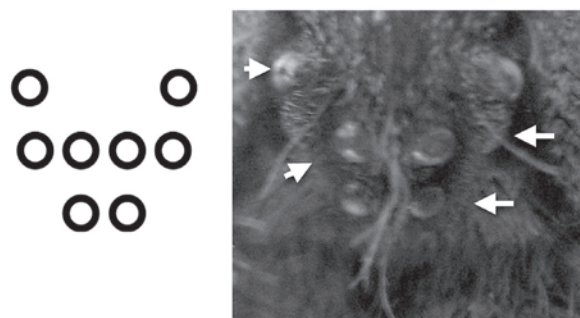
El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica o a partir de sobrenadantes de homogenatos de aparatos venenosos de ejemplares de Misiones (n= 22) y de Jujuy (n= 3). La inmunización se realizó en equinos adultos sanos, mediante métodos convencionales. Los procesos de inmunización y reinmunización (esta última, 90 días tras la inmunización), demandaron 28 días y 6,5 mg de veneno cada uno. La reactividad inmunoquímica del suero y del antiveneno se evaluó mediante inmunodifusión (Figura 3).

A partir del plasma hiperinmunitario se purificó la IgG mediante ácido caprílico. La IgG dializada contra NaCl 0,15 M se llevó a pH 3,0 con HCl N y se trató con pepsina 0,85 mg/ml durante

FIGURA 1. Ejemplar adulto de *Phoneutria nigriventer*. El tamaño de este ejemplar fue de 12 cm (con patas incluidas). Obsérveselo en posición de descanso (a) y en posición de defensa (b), levantando sus dos pares de patas anteriores y presentando los quelíceros (elementos punzantes por medio de los que inocula el veneno y desgarrar el alimento) cuyas bases son de un color rojizo intenso



FIGURA 2. Distribución ocular característica de *Phoneutria*. Esta distribución es propia de este género



30 minutos a fin de obtener fragmentos  $F(ab')_2$ . La pureza de los procesos de obtención se controló mediante SDS-PAGE (Figura 4).

La capacidad neutralizante se evaluó preincubando distintas dosis del antiveneno con 1,5 DMM de veneno (dosis mínima mortal, 1 DMM= mínima dosis que mata al 100% de la población en 48 h), inoculando cobayos, según la metodología utilizada en Brasil para controlar este tipo de antiveneno.<sup>10</sup>

El antiveneno neutralizó totalmente el veneno proveniente de homogenatos de aparatos de arañas de Misiones o de Jujuy, así como de veneno ordeñado (Misiones). Considerando el contenido de proteínas, 35 mg de antiveneno (1 ml) neutralizó 100% la letalidad (3 vivos/3 desafiados), sin que ningún animal mostrase signo alguno de envenenamiento, mientras que 10 mg de antiveneno brindaron una buena neutralización (2 vivos/3 desafiados). En todos los casos se usaron controles positivos de veneno (3 animales), muriendo el 100% en todos los ensayos. Para el trabajo con animales se siguieron los lineamientos éticos sugeridos por el Instituto Nacional de Salud de EE.UU.<sup>11</sup>

### DISCUSIÓN

*Phoneutria* habita principalmente zonas selváticas tropicales o subtropicales.<sup>3,4</sup> Es una araña

errante, de hábitos nocturnos, aunque la mayoría de los accidentes ocurren de día y en construcciones humanas.<sup>8</sup> No existe una estadística nacional sobre los envenenamientos por *Phoneutria*, pero no serían tan comunes como los producidos por otras arañas.<sup>3,4,12</sup> En Brasil causan el mayor porcentaje de accidentes araneicos.<sup>5,9</sup>

En Brasil, el 5% de los casos requiere antiveneno<sup>1</sup> y en Misiones se estima, a lo sumo, en el 10%.<sup>13</sup> En la Argentina, se usa el soro antiaracnídico, que se presenta en ampollas de 5 ml con fragmentos  $F(ab')_2$  de inmunoglobulinas equinas<sup>5</sup> que neutralizan 1,5 DMM/ml de veneno de *Phoneutria*.<sup>5,10</sup> Se dosifica desde 2 a 4 ampollas en casos moderados hasta 5 a 10 en los graves por vía intravenosa.<sup>5,6,10</sup>

FIGURA 3. Doble inmunodifusión de homogenatos de aparatos venenosos de *Phoneutria nigriventer* de las provincias de Misiones (Ph M) o Jujuy (Ph J), frente al antiveneno experimental desarrollado (A-Ph) y frente al soro antiaracnídico del Instituto Butantan (AA), único antídoto disponible mundialmente para tratar este tipo de envenenamientos. Obsérvese la alta reactividad con ambos antivenenos

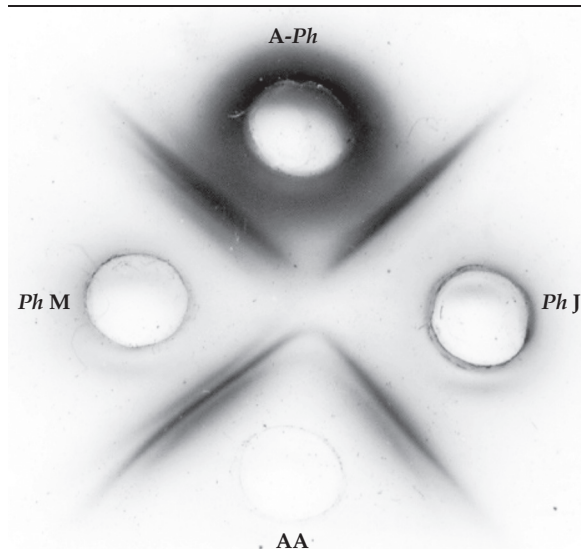
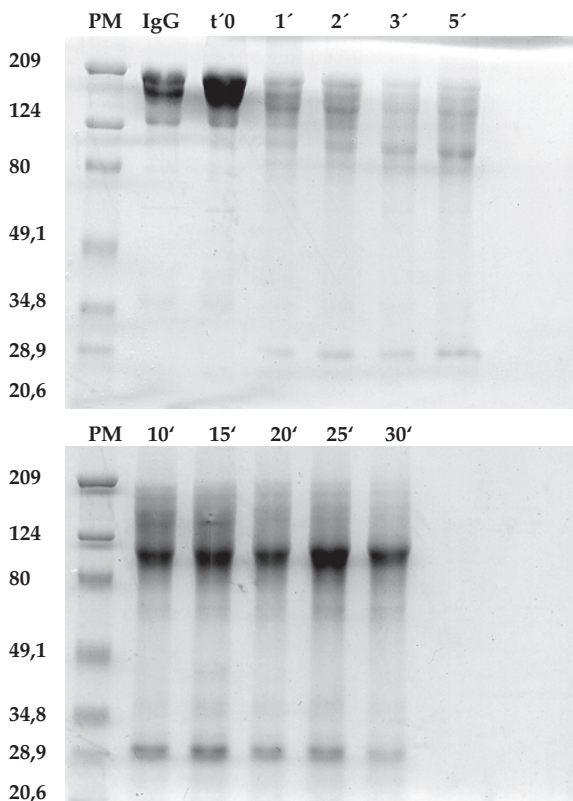


FIGURA 4. Digestión enzimática de los fragmentos  $F(ab')_2$  a partir de la IgG obtenida por precipitación con ácido caprílico. Geles no reductores de A/B 12,5%, se sembraron 5 µg de muestra por calle. Se tiñeron con azul brillante de Coomassie G-250. PM= Marcadores de masa molecular (las masas se indican a la izquierda). IgG= inmunoglobulina G purificada, sin tratamiento enzimático; t'0= IgG tratada con pepsina al minuto 0; los números en las columnas siguientes en ambos geles, indican el tiempo en minutos de la digestión enzimática. La calle final: 30 (30 minutos), muestra la forma final del antiveneno (fragmentos  $F(ab')_2$ )



El esquema de obtención de este antiveneno resultó adecuado para desarrollar un producto con potencia comparable al *soro antiaracnídico*.<sup>5,10</sup> La cantidad de veneno utilizada fue menor a la requerida para la obtención de este tipo de antiveneno. Un plan tradicional consume para la inmunización de base y reinmunización 30-112 mg de veneno (homogenatos de aparatos venenosos),<sup>14</sup> contra 13 mg totales utilizados en este trabajo. Respecto a la cantidad de ejemplares, la bibliografía refiere un mínimo de 34-38 ejemplares y en este esquema se utilizaron 25.<sup>14</sup> La concentración de proteínas del antiveneno fue inferior a la que habitualmente poseen aquellos para uso terapéutico, que oscilan generalmente entre 40 a 140 mg/ml. También fue menor a la del *soro antiaracnídico* (80 mg/ml) y estuvo muy por debajo del límite sugerido por la Organización Mundial de la Salud,<sup>15</sup> lo que confirma su buena potencia.

Para la producción de antivenenos, el paso primordial es la obtención de veneno y el hallazgo dificultoso de *Phoneutria* en la Argentina complica la producción de éste antídoto. Sin embargo, con el número de arañas utilizado, se obtuvo suficiente veneno para generar una respuesta inmunitaria de magnitud tal que permitió desarrollar un antiveneno con buena capacidad neutralizante. Una mayor cantidad de veneno facilitaría los procesos de inmunización y control, pero el veneno obtenido a partir de una cantidad de ejemplares como la utilizada en este trabajo parece ser adecuada para el logro de este antiveneno.

Dada la escasa cantidad de accidentes por *Phoneutria* que requieren tratamiento, una producción mínima de antiveneno podría cubrir las necesidades nacionales. Si se considera la cantidad de accidentes por esa especie,<sup>4,5</sup> la proporción de pacientes que requieren tratamiento con antiveneno (5-10%)<sup>13</sup> y que los accidentes hasta ahora solo son comunicados por Misiones,<sup>3,4,13</sup> la cobertura nacional sería posible. Esta provincia comunicó, en los últimos años (2005-2009), 147 casos de accidentes por araña/año (Condensado por Ubicación Geográfica, planillas C2, Ministerio de Salud). Si todos esos fueran por *Phoneutria* y 10% requiriesen antiveneno, 150 viales cubrirían todas las necesidades anuales, lo que se alcanzaría fácilmente (y superaría) con este esquema de inmunización.

De acuerdo a lo realizado, concluimos que este antiveneno podría ser producido en países como el nuestro, en los que el tratamiento se ve limitado

por la disponibilidad de antiveneno, supeditada a los excedentes de producción del único productor mundial. ■

## BIBLIOGRAFÍA

1. Isbister GK, Graudins A, White J, Warrell D. Antivenom treatment in arachnidism. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003; 41(3):291-300.
2. Lucas SM. Aranhas de Interesse Médico no Brasil. En: Costa Cardoso JL, Siqueira Fanca FO, Fan HW, Sant'Ana Málaque CM, Vidal Haddad Jr. Editores. Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. San Pablo: Sarvier, FAPESP; 2003. Págs.141-149.
3. González A. Taxonomía de arañas. Arañas ponzoñosas de la Argentina. *Bol Acad Nac Med* 1985; (Supl):9-19.
4. Martino O, Mathet H, Masini RD, Ibarra Grasso A, et al. Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origen animal. Estudio Epidemiológico, clínico y experimental. Ministerio de Bienestar Social de la Nación. Secretaría de Salud, Buenos Aires, Argentina; 1979. Págs. 105-115.
5. Ministerio de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamiento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1999.
6. Bucarechi F, de Deus Reinaldo CR, Hyslop S, Madureira P, et al. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the Genus *Phoneutria*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42(1):17-21.
7. Matalavel A, Fleury C, Oliveira LC, Molina F, et al. Structure and activity analysis of a two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry* 2009; 48(14):3078-3088.
8. Antunes E, Sant'Ana Málaque CM. Mecanismo de ação de veneno de *Phoneutria* e aspectos clínicos de foneutrismo. En: Costa Cardoso JL, Siqueira Fanca FO, Fan HW, Sant'Ana Málaque CM, Vidal Haddad Jr, Editores. Animais peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapêutica dos acidentes. San Pablo: Sarvier, FAPESP; 2003. Págs. 154-159.
9. Azarkevich E. Murió un chico picado por una araña porque el antídoto estaba vencido. *Clarín* 2006 Mar 24 [Acceso: 24 Mar 2006]. Disponible en <http://edant.clarin.com/diario/2006/03/24/sociedad/s-04801.htm>.
10. Ministerio de Saúde. Normas Técnicas de fabricação e controle de qualidade dos soros antiofídicos, antitóxicos em antirrábico aprovada pela vigilância sanitária. Brasília: Ministerio de Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária; 1996.
11. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. México DF: Acad Nac Med 2002.
12. de Roodt AR, Salomón OD, Lloveras SC, Orduna TA. Poisoning by spiders of *Loxosceles* genus. *Medicina (B. Aires)* 2002; 62(1):83-94.
13. Stetson R. Guía de identificación, de manifestaciones y tratamiento para accidentes con *Phoneutria* (araña del bananero). 2ª Ed. Misiones: Ministerio de Salud Pública, Dirección de Epidemiología y Dirección de Saneamiento Ambiental; 1988.
14. Rolim Rosa R, Siles Villarroel M, Vieira EGJ, Iizuka H, Navas J. Produção de soro antiaracnídico polivalente mediante inoculações simultâneas de venenos em um mesmo animal. *Mem Inst Butantan* 1980/81; 44/45: 253-258.
15. World Health Organization. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Geneva: World Health Organization, 2010. Pág. 70.