

Efectos cardiovasculares del veneno de *Bothrops asper* en corazón de anfibios

por

Orlando Morales*, Manuel Sandí* y Marielena Calderón*

(Recibido para su publicación el 7 de noviembre de 1975)

Abstract: Lyophilized *Bothrops asper* venom was assayed on toad heart *in situ* and frog heart *in vitro* to study cardiac abnormalities in the frequency, inotropic effect and arrhythmia. Heated venom was also used to test the effect of lower toxic molecular weight components.

With either crude or heated venom the cardiac frequency was decreased, with a marked negative inotropic effect in the toad heart, which showed in several cases 2:1 heart block.

Los venenos de serpientes producen profundas alteraciones cardiovasculares pudiendo localizarse su efecto en corazón, capilares sistémicos, circuito pulmonar o aún en los centros bulbares, tal como ha sido extensivamente revisado (**Jiménez-Porras**, 1968; **Morales**, 1970; **Rusell y Scharffenberg**, 1964). La acción directa sobre corazón ha sido sugerida en trabajos de **Amuchastegui** (1940) y **Cohen y Sumyk** (1966); éste último observó que el veneno de cobra en gatos produce una profunda caída de la presión, acompañada de bradicardia.

Bhanganada y Perry (1963), trabajando con veneno de cobra, encontraron una disminución en la descarga ventricular y en el gasto cardíaco, lo cual indicaría lesión miocárdica, como ha sido confirmado por **Matsusaki et al.** (1961), al encontrar alteraciones histológicas en corazón luego de la inyección del veneno; y por estudio de ultraestructura que demostró focos hemorrágicos y áreas de isquemia (**Abel, et al.**, 1973).

En estudios de corazón aislado de conejo, perfundido con solución salina que contenía veneno de cascabel en dosis de 1 mg/100 ml, se ha observado que el latido originalmente fuerte se volvió más débil y entró en paro cardíaco al poco tiempo, con un corazón edematoso (**Essex y Markowitz**, 1930).

Otros autores, **Bhanganada y Perry** (1963) y **Brown** (1940) observaron que al administrar dosis muy diluidas de veneno de cascabel no se obtienen cambios en el

* Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

latido de corazón de rana, pero con dosis un poco mayores hubo aumento de la fuerza de contracción, arritmias, y por último el paro. Con continuos lavados con Ringer estos efectos desaparecieron, pero con dosis mucho más altas de veneno se observó más bien una disminución progresiva, hasta llegar a paro cardíaco, sin recuperación al hacer lavados con Ringer.

El propósito de esta investigación fue estudiar los efectos cardiotoxicos que produce el veneno de Terciopelo, *B. asper*, en la frecuencia cardíaca, contractibilidad y conducción de impulsos en corazones de ranas y sapos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron dos preparaciones, corazón de sapo (*Bufo marinus*) *in situ* y corazón de rana (*Rana pipiens*) *in vitro*, como a continuación se describe:

Corazón de sapo *in situ*: Se tomaron sapos con peso entre 150 y 250 g; fueron decerebrados y preparados para registro de contracciones atriales y ventriculares por los métodos usuales de laboratorio (Morales, 1969). Se hicieron mediciones control durante 10 minutos antes de proceder a inyectar la dosis de veneno correspondiente. Las dosis utilizadas fueron: dosis baja, 0,25 mg; media, 0,50 mg y dosis alta de 0,75 mg por cada 10 gramos de peso del animal y un grupo testigo de 5 sapos que recibió solución salina.

El veneno de *B. asper* se tomó de una mezcla liofilizada con una DL_{50} de 1,09 mg/kg de peso ratón de 18 a 20 g, se disolvió en solución salina, y se inyectó directamente en el ventrículo.*

En los diferentes registros se estudió la automaticidad cardíaca (Lat/min); la contractilidad cardíaca, midiéndose para tal efecto la altura de las ondas; la conductibilidad se evaluó por observación de los bloques cardíacos. Las observaciones se hicieron a intervalos de 5 minutos, hasta que se produjo paro ventricular.

Corazón de rana *in vitro*: Se decapitó a ranas de tamaño uniforme con un peso promedio de 28 g, y por rápida disección se aisló el corazón para colocarlo en una cámara de vidrio para órgano aislado, que contenía solución Ringer para animales de sangre fría.

Fue utilizado veneno de las mismas características que el usado en la preparación anterior, a concentraciones finales en el medio de 0,11 mg/ml que se administró en dos formas: veneno calentado y crudo.

Para obtener el veneno calentado se pesó el veneno, se disolvió en solución salina, y se hirvió en baño maría por 30 minutos (temperatura 96,3C); se centrifugó luego y se tomó el sobrenadante, descartándose el precipitado.

Se montaron 10 corazones de rana para la aplicación de la dosis 0,2 mg/ml y otros 10 para la dosis de 0,1 mg/ml; 5 corazones de cada grupo fueron tratados para veneno crudo y 5 para veneno calentado, además de 5 preparaciones testigo.

Antes de proceder a la adición del veneno, se hicieron registros control por 5 minutos y se continuaron las observaciones de frecuencia cardíaca/min a intervalos de 5 minutos, hasta que cesó el latido ventricular.

* El veneno fue gentilmente donado por el Instituto Clodomiro Picado.

RESULTADOS

En corazón de *Bufo marinus in situ* la inyección de cualquiera de las tres dosis de veneno en el ventrículo produjo alteraciones en la frecuencia cardíaca, fuerza de contracción y bloqueos:

- a) **Frecuencia y duración de la actividad cardíaca:** La disminución de la frecuencia cardíaca aparece resumida en el Cuadro 1 e ilustrada en la Figura 1, para las tres dosis. Con la dosis baja se obtiene, inmediatamente después de la inyección, un leve aumento en la frecuencia sobre el valor testigo de 49,4, pero rápidamente se inicia la disminución, alcanzándose un descenso máximo a los 25 minutos, hasta de 41,2 lat/min, 5 minutos antes de cesar los latidos ventriculares. La disminución en la frecuencia cardíaca con la dosis media fue rápida y alcanzó de 49,4 lat/min (valores testigo) a 41,6 lat/min en los primeros 5 minutos, bajando hasta 32,8 lat/min a los 20 minutos, cuando cesó el latido ventricular. Con la dosis alta, la caída de frecuencia fue rápida pero, de corta duración pues a los 10 minutos ya había paro cardíaco.

El tiempo de duración en el grupo testigo contrasta grandemente con los tratamientos, durando la preparación por más de 6 horas. Las frecuencias y los tiempos de duración son aquellos que corresponden a los cinco animales de cada tratamiento.

El último animal de cada grupo sobrevivió por un tiempo de 37, 30 y 17 minutos, respectivamente, después de haberse administrado la dosis baja, media y alta.

- b) **Disminución de la fuerza de contracción ventricular y arritmias:** En los corazones testigo, el promedio de la altura de las contracciones ventriculares fue muy regular, notándose apenas una ligera disminución en los últimos períodos de observación, pero notoria la disminución en los animales tratados (Fig. 2 y Cuadro 2).

El efecto obtenido con cualquiera de las tres dosis fue una disminución en la altura de la contracción, que cayó desde sus valores de control hasta 2,1, 2,5 y 2,7 mm. Curiosamente no aparecen en el orden esperado de acuerdo con la concentración usada. El registro del grupo testigo y los controles de cada tratamiento, no presentaron alteraciones en la conducción de impulsos.

En dos de cinco sapos inyectados con la dosis baja se obtuvieron bloqueos de II grado tipo 2:1, prolongándose estos por tiempos relativamente largos. Se registró la aparición de los bloqueos que fue a los 15 y 20 minutos, manteniéndose esta irregularidad hasta el cese del latido ventricular.

En los cinco corazones de sapo escogidos para aplicarles la dosis media, se registraron bloqueos cardíacos de II grado, tipo 2:1, cuya duración varió de la siguiente manera: dos de ellos aparecieron a los 10 y 30 min, desapareciendo luego a los 20 y 35 min respectivamente. En los restantes tres corazones los bloqueos se mantuvieron por tiempo más prolongado (Fig. 3).

De los cinco corazones tratados con la dosis alta se observan marcadas diferencias con respecto a las dosis anteriores, cuatro de estos

CUADRO 1

Disminución de la frecuencia cardíaca (lat/min) en el sapo (Bufo marinus) por inyección intraventricular de tres diferentes dosis de veneno de Bothrops asper.

Dosis/10 g	Nº. Animales	Testigo	Minutos							
			5	10	15	20	25	30	35	40
0,25 mg	5	X = *49,4	52,0	51,2	44,0	42,2	41,2	44,8		
		S = *12,1	7,3	7,9	11,4	10,4	9,5	6,4		
0,50 mg	5	X = *53,2	41,6	39,6	35,2	32,8				
		S = 9,9	19,9	19,9	22,5	19,7				
0,75 mg	5	X = 48,6	38,4	37,6						
		S = 14,8	15,9	13,5						
Testigo **	5	X = 31,6	50,4	50,4	50,4	50,4	51,6	51,6	51,6	51,6
		S = 3,6	1,4	1,4	1,4	1,4	3,6	3,6	3,6	3,6

* \bar{X} = Promedio, S = Desviación estándar.

** Los corazones del grupo testigo se mantuvieron latiendo un promedio de 390 minutos.

CUADRO 2

Alteración de la altura (mm) de las contracciones ventriculares del corazón de sapo, in situ usando tres dosis diferentes de veneno de Bothrops asper.

Dosis/10 g	No. Animales	Testigo	Minutos							
			5	10	15	20	25	30	35	40
0,25 mg	5	$\bar{X} = 4,7$	3,8	3,1	2,6	2,1				
0,50 mg	5	$\bar{X} = 3,5$	2,8	2,7	2,5					
0,75 mg	5	$\bar{X} = 3,9$	2,9	2,7						
Testigo **	5	$\bar{X} = 3,8$	3,8	3,8	3,8	3,8	3,7	3,6	3,6	3,5

* \bar{X} = Promedio

** Las contracciones ventriculares del grupo testigo duraron 390 minutos.

presentaron bloqueos de II grado, tipo 2:1, apreciándose muy poco el efecto, dado que murieron a los 5 minutos de ser aplicada la dosis.

En los corazones de rana *in vitro* los efectos del veneno fueron:

- a) **Frecuencia cardíaca:** Los corazones de ranas *in vitro* sometidos a dos diferentes preparaciones de veneno de *B. asper* y utilizando dos diferentes dosis presentaron disminución de la frecuencia cardíaca. Sin embargo, se pudo notar que esta disminución fue más notable en aquellas preparaciones en que se usó veneno crudo que en las que se usó el veneno calentado. Una observación interesante es que el veneno calentado tiene efecto tóxico, a pesar de que se han desnaturalizado sus enzimas (Cuadro 3 y Fig. 3).

Con el veneno crudo y en dosis de 0,20 mg/ml la frecuencia cardíaca cuyo control fue de 64,8 y 59,2 lat/min disminuyó hasta 41,6 lat/min, 5 minutos antes del cese del latido ventricular. Con la misma dosis, pero con veneno calentado los controles fueron de 64,8 y 50,4 lat/min y a los 20 minutos, que fue cuando dejó de latir el ventrículo, la frecuencia cardíaca fue de 37,6 lat/min (Cuadro 3).

Con veneno crudo y usando dosis de 0,11 mg/ml la disminución en frecuencia fue menor, de 60,0 y 53,6 lat/min en los controles; disminuyó a 48,8 lat/min, 5 minutos antes del cese ventricular. Con esta misma dosis, pero usando el veneno calentado la frecuencia cardíaca en el control fue de 68,8 y 60,0 lat/min, que disminuyó a 40,0 lat/min a los 20 minutos de haberse inoculado el veneno.

- b) **Duración del latido ventricular:** El tiempo que duraron latiendo estos corazones varió según las dosis y las preparaciones de veneno que se usaron. Así, como puede observarse en el Cuadro 3, con dosis altas de veneno crudo, duraron latiendo por 20 minutos; con el mismo veneno crudo pero en dosis bajas duraron 24 minutos. Usando veneno calentado a una temperatura de 96,3°C latieron 30 minutos y con dosis altas, el tiempo promedio fue de 27 minutos. Con dosis bajas el tiempo fue de 30 minutos, habiendo poca diferencia con el control que fue de 35 minutos.

DISCUSION

Las inyecciones intraventriculares del veneno de *B. asper* en corazón de sapo produjeron alteraciones cardíacas que disminuyeron la frecuencia, y fuerza de contracción y originaron arritmias. En corazón aislado de rana, el veneno también disminuyó la frecuencia cardíaca.

En todas las preparaciones experimentales de este estudio, la frecuencia cardíaca empezó a disminuir inmediatamente después de la inyección del veneno (Cuadros 1, 2), lo que sugiere una alteración en el mecanismo de excitación cardíaca.

Fue muy evidente que la fuerza de contracción disminuyó luego de la inyección del veneno (Cuadro 2 y Fig. 2). **Essex y Markowitz** (1930) encontraron que en un corazón aislado y perfundido con solución salina de fuerza de contracción

CUADRO 3

Disminución de la frecuencia cardíaca (lat/min) en corazones aislados de rana sometidos a dos preparaciones de veneno de B. atrox y utilizando dos dosis diferentes

Tratamientos y		TIEMPO (Minutos)							
dosis		Control	5	10	15	20	25	30	35
Veneno crudo	0,20 mg/ml	\bar{X} = 62,0	57,6	48,0	41,6	35,6			
		S = 39,5	14,2	10,8	10,8	7,2			
	0,11 mg/ml	\bar{X} = 56,8	47,2	48,8	46,4				
		S = 11,9	21,2	16,8	17,5				
Veneno calentado	0,20 mg/ml	\bar{X} = 56,7	59,2	48,8	44,0	37,6			
		S = 17,5	11,6	10,7	11,3	8,3			
	0,11 mg/ml	\bar{X} = 64,4	58,4	53,0	44,8	40,0			
		S = 8,2	7,8	7,3	5,8	11,0			
Testigo	Solución	\bar{X} = 68,4	68,0	68,0	55,2	40,8	35,2	29,6	26,8
	Salina	S = 5,6	4,8	4,9	8,7	9,9	8,2	11,5	11,4

* \bar{X} = Promedio, S = Desviación estándar

disminuyó apenas se le agregaba la solución conteniendo veneno. También se ha reportado por **Dutra de Oliveira** (1966) que con veneno de Cascabel (*Crotalus terrificus*) se disminuye la fuerza del latido en corazón de rana. Trabajos de este mismo autor evidencian claramente que la alteración cardíaca que produce el veneno va de acuerdo con la concentración, por lo que con diferentes dosis se observan diferentes efectos. Así, con dosis muy diluidas del veneno, no hay cambios ni en la amplitud de la contracción ni en la frecuencia cardíaca. Sin embargo, a dosis altas se produce disminución progresiva e irreversible de la fuerza de contracción, lo que indica el efecto tóxico del veneno sobre el corazón.

Hallazgos similares han sido hechos por **Brown** (1940) con la mocasín acuática (*Agkistrodon piscivorus*) ya que a dosis altas se produce un marcado descenso en la frecuencia cardíaca y en la fuerza de contracción del latido.

Los resultados de nuestros experimentos corresponderían pues, a los efectos esperados con la administración de veneno pero a altas dosis, ya que siempre se obtuvo disminución en la frecuencia cardíaca y en la fuerza de contracción.

Con cualesquiera de las 3 dosis utilizadas en los experimentos en corazón de sapo, hubo disturbios en la conducción del impulso cardíaco y que siempre en cierto número de animales de cada grupo experimental aparecieron bloqueos de II grado 2:1.

Algunos trabajos electrocardiográficos con veneno de cobra y cascabel en perros y conejos no describen alteraciones (**Radomsky y Deichmann**, 1957), pero se han reportado arritmias y alteraciones electrocardiográficas compatibles con daño miocárdico (**Soaje-Echague**, 1940; **Rusell y Michaelis**, 1960).

Una observación interesante fue la obtenido usando veneno calentado de *B. asper* y agregando el sobrenadante a los corazones aislados de rana: disminuyó la frecuencia cardíaca, esto a pesar de que la toxicidad enzimática se ha eliminado debido a la coagulación por calor de las proteínas del veneno. Esto sugiere que hay componentes no proteicos que contribuyen a la cardiotoxicidad del veneno, (**Devi**, 1968). Se han hecho estudios con veneno crudo y calentado disueltos en salina (**Soaje-Echague**, 1940) reportándose resultados variables: hubo estimulación con veneno de cobra y depresión de la actividad cardiovascular con veneno de *Vipera russelli*.

Puede concluirse que el veneno de *B. asper* en corazones de sapo y rana, bajo nuestras condiciones experimentales tiene un efecto cardiotóxico, manifestado por la depresión en la frecuencia del latido, la disminución de la fuerza de contracción ventricular y aparición de bloqueos cardíacos.

El grado de alteración en la función miocárdica para las variables estudiadas fue proporcional a la concentración del veneno usado. Además, tanto el veneno crudo como el calentado tienen efecto cardiotóxico, aunque éste menor que aquél.

Debido a que había un modelo cardiovascular y otro puramente cardíaco, ambos afectados por el veneno, puede suponerse la presencia de un factor cardiotóxico. En otras especies se han demostrado alteraciones en el corazón de varios tipos: cambios en el metabolismo del miocardio (**Badano y Stoppani**, 1964) lesiones histológicas (**Abel et al.**, 1973; **Matsusaki et al.**, 1961) y cambios electrofisiológicos en el potencial de acción (**Matsusaki et al.**, 1961). Sin embargo, el aislamiento de cardiotoxinas sólo ha sido reportado para serpientes de la familia Elapidae como se desprende de estudios y revisiones recientes (**Chang y Lee**, 1966; **Jiménez-Porras**, 1970). Por lo tanto el aislamiento de fracciones cardiotóxicas de *B. asper* será estudiado próximamente.

RESUMEN

Se estudió el efecto del veneno de *Bothrops asper* sobre corazones de anfibios utilizando preparaciones *in situ* de sapo y de corazón aislado de rana. En todos los casos hubo disminución de la frecuencia cardíaca y de la fuerza del latido ventricular cuya intensidad fue en relación directa con las dosis empleadas. La conducción de impulsos cardíacos se vio afectada, observándose con frecuencia bloqueos de II grado 2:1 con cualesquiera de las 3 dosis usadas. Se encontró que tanto el veneno crudo como el calentado tienen un efecto depresor sobre las variables estudiadas, lo cual sugiere cardiotoxicidad tanto en los componentes proteicos totales como en otros de menor peso molecular.

REFERENCIAS

- Abel, J. H., Jr., A. W. Nelson, & C. A. Bonilla
1973. *Crotalus adamanteus* basic protein toxin: electron microscopic evaluation of myocardial damage. *Toxicon*, 11:59.
- Amuchastegui, S. R.
1940. Action du venin de *Bothrops alternatus* sur le coeur et la dynamique circulatoire. *C.R. Soc. Biol. Paris*, 133: 317-319.
- Badano, B. N., & A. O. M. Stoppani
1964. The action of *Bothrops* venom on the Keilin-Hartree heart muscle preparation. *Biochem. Pharmacol.*, 13: 793-795.
- Bhanganada, K., & J. F. Perry, Jr.
1963. Cardiovascular effects of cobra venom. I. *J. Amer. Med. Ass.*, 183: 125-259.
- Brown, R. V.
1940. The action of water moccasin venoms on the isolated frog heart. *Amer. J. Physiol.*, 130: 613-619.
- Chang, C. C., & C. Y. Lee
1966. Electrophysiological study of neuromuscular blocking action of cobra neurotoxin. *Brit. J. Pharmacol.*, 28: 172-181.
- Cohen, M., & G. B. Sumyk
1966. Cardiovascular and respiratory effects of cobra venom and a venom fraction. *Toxicon*, 3: 291-295.
- Devi, A.
1968. The protein and nonprotein constituents of snake venoms, p. 119-165. In W. Bücherl, E. E. Buckley & V. Deulofeu (eds), *Venomous animals and their venoms*. Vol. I. Academic Press, New York.
- Dutra de Oliveira, J.
1932. Action of snake venoms on the heart. *Brazil Med.*, 46:265.
- Essex, H. E., & J. Markowitz
1930. The physiology of rattlesnake venom (Crotalin). VII. The similarity of crotalin shock and anaphylactic shock. *Amer. J. Physiol.*, 92: 698-704.
- Jiménez-Porras, J. M.
1968. Pharmacology of peptides and proteins in snake venoms. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 8: 299-318.

Jiménez-Porras, J. M.

1970. Biochemistry of snake venoms. *Clin. Toxicology*, 3: 389-431.

Matsusaki, K., K. Doono, H. Nakao, & T. Toriyama

1961. Effect of *Trimeresurus* venom on electrical activity of single ventricular muscle fiber of chicken. *Med. J. Kagoshima Univ.*, 13: 153-157.

Morales, O.

1969. *Manual de prácticas de fisiología*. Departamento de Publicaciones, Universidad de Costa Rica, 144 pp.

Morales, O.

1970. *Alteraciones cardiovasculares y respiratorias producidas en el perro por dosis subletales de veneno de Bothrops atrox, por vía intraperitoneal e intramuscular*. Tesis, Lic. Biología Universidad de Costa Rica. 82 pp.

Radomsky, J. L., & W. B. Deichmann

1957. Comparative pharmacological studies of *Crotalus adamanteus* and *Naja flava* venoms. *Fed. Proc.*, 16: 328-329.

Soaje-Echague, E.

1940. Alteraciones circulatorias producidas por el veneno de *Crotalus terrificus*. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 16: 475-479.

Russell, F. E., & B. A. Michaelis

1960. Cardiovascular effects of *Crotalus* venom. I. *Med. Arts Sci.*, 14: 119-121.

Russell, F. E. & R. S. Scharffenberg

1964. *Bibliography of snake venoms and venomous snakes*. Bibliographic Assoc., Inc. West Covina, California. 220 pp.

Fig. 1. Disminución de la frecuencia cardíaca (lat/min) en corazones de sapo, con tres dosis diferentes de veneno de *B. asper*.

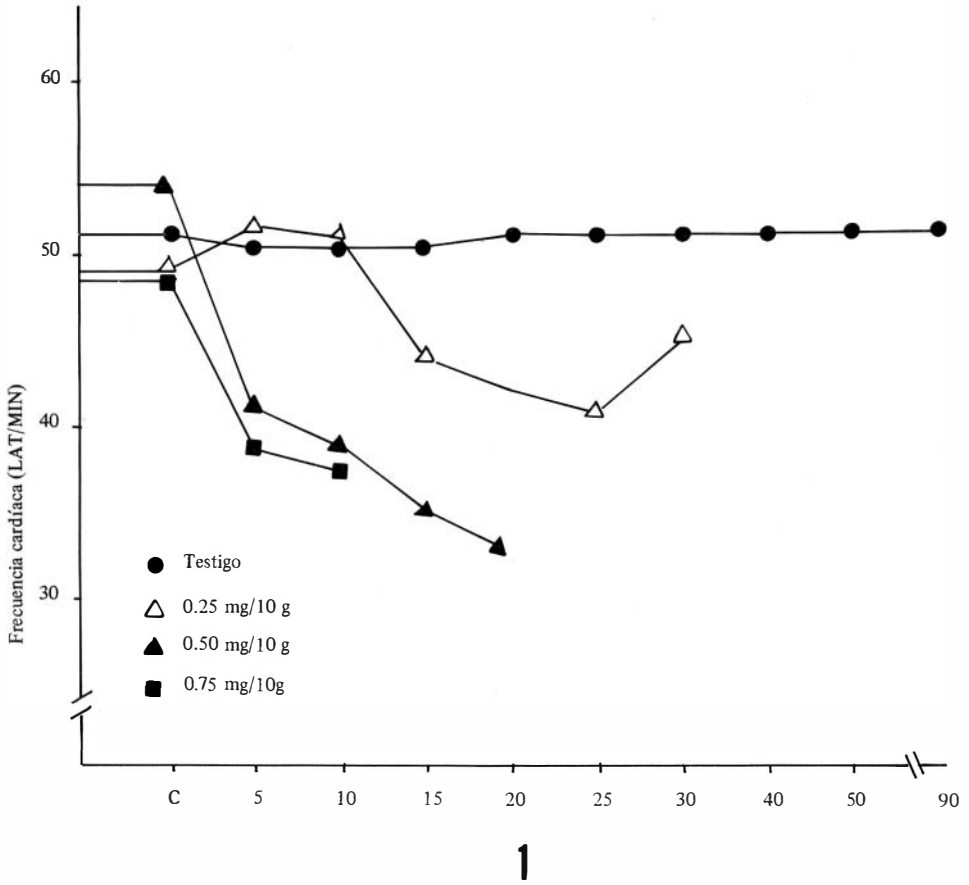
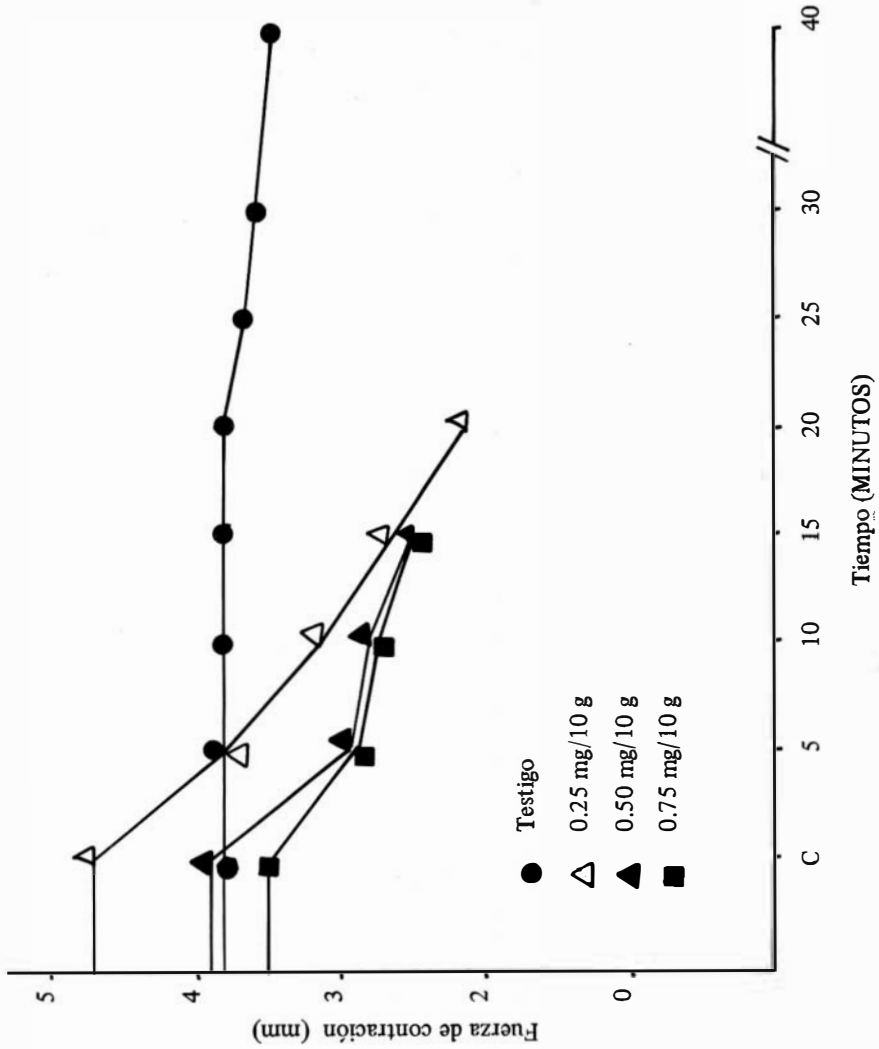


Fig. 2. Alteración de la altura promedio (mm) de las contracciones ventriculares del corazón de sapo usando tres dosis diferentes de veneno de *B. asper* y un grupo testigo.



2

Fig. 3. Alteración de la frecuencia cardíaca (lat/min) en corazones aislados de rana sometidos a dos concentraciones de veneno de *B. asper*, crudo y calentado.

