

**Cardiotoxicidad inducida por veneno crudo en Mapanare
(*Bothrops colombiensis*) en modelo experimental de
embrión de pollo "*In vivo*" e "*In Vitro*".**

Marco Álvarez^{1*}, María Eugenia Girón², José Miguel Ercolino³, Elizabeth

Suárez¹, Lourdes Perdomo¹, Alexis Rodríguez-Acosta²

¹Sección de Microscopía Electrónica, Instituto Anatómico "José izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

²Sección de Inmunoquímica, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Morfologías Anormales, Instituto Anatómico José izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: Dr. Marco Alvarez: Telf. 0212-6053439.

e-mail: marco.alvarez@ucv.ve

<http://www.med.ucv.ve/IA/SecMicElec.htm>

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la cardiotoxicidad inducida por una concentración subletal cincuenta (CSL₅₀) de veneno crudo de *Bothrops colombiensis*, en modelo experimental de embrión de pollo "in vivo" e "in vitro". El uso del Videocardiograma (VCG) y el ensayo metabólico con el colorante vital Verde Janus, permitió determinar "in vivo", la Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP) y los niveles de oxido-reducción en embriones de pollo de 3½ y 4 días de desarrollo, antes y después del tratamiento. El área vascular embrionaria fue analizada. La incubación de mioblastos cardíacos, cultivados en Gota pendiente, con 3,3 dimetiloxicarbonocianida (DiOC₁ (3), permitió determinar "in vitro", el marcaje de mitocondrias y su modificación morfológica en la población de las células controles y tratadas. La FCP de embriones tratados, presento un 18%, de reducción significativa respecto al grupo control. El colorante vital Verde Janus, mostró un cambio en el nivel de oxido-reducción de la porción lumbar-torácico embrionaria, acompañado de numerosos núcleos hemorrágicos. El área vascular presento neo-vascularización. A nivel celular, se observo la disrupción de la monocapa celular, con perdida de la confluencia, homogeneidad y extensión del halo de crecimiento. Los mioblastos presentaron formas redondeadas y numerosos filamentos citoplasmáticos. La estructura mitocondrial perdió su morfología ortodoxa. Se observo una redistribución de la fluorescencia hacia la estructura nuclear. Estos resultados permiten sugerir que probablemente el veneno de *B.colombiensis* pudiera estar promoviendo la activación de factores mitocondriales y otras vías constitutivas de muerte celular. En la actualidad, los conocimientos relativos a la cardiotoxicidad son limitados; por lo que se hace necesaria la realización de nuevos estudios exhaustivos en esta área.

Palabras claves: *B. colombiensis*, veneno crudo, CSL₅₀, frecuencia cardíaca promedio (FCP), Videocardiograma (VCG), oxido-reducción, Verde Janus, mitocondria, DiOC₁ (3).

Abstract

Cardiotoxicity induced by Mapanare (*Bothrops colombiensis*) crude venom on chicken embryo in vivo and in vitro experimental model

The research evaluated the cardiotoxicity induced by half sub-lethal concentration (SLC₅₀) of crude venom of *Bothrops colombiensis*, "in vivo" and "in vitro". The average heart rate, changes in embryonic oxidation-reduction levels as well as mitochondria structural condition on the cardiac myoblasts grown-up in primary Hanging-drop culture incubated with DiOC₁(3), before and after an hour of treatment, were measured. The Videocardiogram (VCD), the shift from blue to pink in the vital dye Janus Green and redistribution of fluorescence was used to estimating changes. Chick embryos of 3 ½ and 4 days of development, subject to the SLC₅₀ of crude venom showed 18% significant reduction in heart rate. The reduction in heart rate was accompanied by changes in oxidation-reduction level in thoracic-lumbar area of the embryo, with the presence of nucleus bleeding. A rapid angiogenic response was observed. At cellular level, there is a disruption of the cell monolayer, loss of convergence, uniformity and extent of the halo of growth. The myoblasts lose the star form, rounded shapes and numerous cytoplasm filaments appearing. The mitochondria structural are lost, together with the homogenous appearance of fluorescence. These results allow suggesting that probably *B.colombiensis* poison should be promoting the activation of factors mitochondriales and other constitutive routes of cellular death. At present, the knowledge relative to the cardiotoxicidad is limited; by what there becomes necessary the accomplishment of new exhaustive studies in this area.

Keyword: *B. colombiensis*, crude venom CSL₅₀, cardiotoxicity, average heart rate (FCP), video-cardiogram (VCD), oxidation-reduction, Janus Green, mitochondria , DiOC₁ (3).

Introducción

La cardiotoxicidad que resulta de la agresión ejercida, sobre el sistema cardiovascular, por parte de factores ambientales, ha sido reconocida desde hace mucho tiempo ⁽¹⁾. Sin embargo, solo recientemente se ha venido recopilando información concerniente a los eventos celulares, las rutas de señalización y los mecanismos moleculares vinculados con la respuesta toxicológica del miocardio ante diferentes tóxicos y contaminantes ambientales ⁽²⁾. Tanto las alteraciones fisiológicas como las alteraciones metabólicas aparecen como respuestas tempranas a la acción de tóxicos ambientales, siendo la depresión cardíacas, las arritmias y el desbalance energético, algunos de los eventos que ejemplifican dichas alteraciones ⁽³⁾. Un agente tóxico de gran importancia en Venezuela, por su reconocida actividad proteolítica, procoagulante, hemorrágica y miotóxica, es el veneno crudo de *Bothrops colombiensis*. A pesar de la reconocida toxicidad del veneno de *B colombiensis*, vinculada con múltiples efectos locales y sistémicos ^(4,5,6), la posible acción cardiotoxicológica del mismo no ha sido claramente establecida y hasta donde se conoce, no ha sido descrito, si la actividad cardiotoxicológica del veneno crudo de *B colombiensis*, se encuentra vinculado o no con algunas alteraciones de tipo fisiológico y/o metabólico lo cual pudiera contribuir al conocimiento de algún blanco subcelular relacionado con tan severa acción tóxica. En el presente trabajo se hace uso del modelo experimental de embrión de pollo, "in vivo" e "in vitro", para evaluar algunas características de la posible acción cardiotoxicológica del veneno crudo de *B colombiensis*.

Materiales y Métodos

"In vivo".

Veneno crudo.

El veneno crudo de *B.colombiensis* utilizado, fue obtenido a partir del ordeño manual realizado en serpientes *Bothrops colombiensis*, colectadas en diferentes regiones del Estado Aragua, en Venezuela. El producto del ordeño fue liofilizado, congelado y mantenido a -20°C. A partir del liofilizado fue preparada una solución madre de veneno bothrópico de 2 mg/ml en solución salina 0.9%, pH 7,4. El ensayo se llevo a cabo con 20 µL de una concentración subletal cincuenta (CSL₅₀) de 37,67 µg/mL calculada en experimentación previa

Actividad cardiaca. Frecuencia Cardiaca Promedio (FCP)

Los cambios en la Frecuencia Cardiaca Promedio (FCP) fueron evaluados a través del análisis de Videocardiograma (VCD), un método experimental poco invasivo ⁽⁷⁾. Los VCG fueron realizados sobre el área cardiaca, de embriones de pollo de 4,½, 5, días de desarrollo, expuesta a través de una ventana realizada sobre la superficie del huevo ⁽⁸⁾. Los registros filmicos fueron realizados, bajo temperatura de incubación de 37°C y humedad de 85%, antes y después de una hora (1h) de tratamiento. Los mismos fueron capturados con una cámara digital Nikon E8400, de velocidad de registro de 200 cuadros/seg, adaptada a un microscopio estereoscopio Nikon. El área vascular fue analizada bajo el microscopio estereoscópico. Todos los embriones fueron obtenidos de huevos fértiles provenientes de Gallinas "Shaver Red Sex-Link", adquiridos de la "Granja Avícola, M. Alfonso", ubicada en San Antonio de los Altos, Estado Miranda, Venezuela.

Oxido-reducción del colorante vital Verde Janus.

Los embriones de pollo de 4½ -5 días de desarrollo⁽⁹⁾ analizados, controles y tratados, fueron incubados "*in vivo*", en una solución de 0,2 mg/mL de Verde Janus ⁽¹⁰⁾, en cámara de anaerobiosis o Jarra de Gaspak, marca Merck, de 2,5 litros, durante 1h a 37°C. El viraje del color azul a rosa del colorante vital permitió visualizar el nivel de oxido-reducción del sistema.

"In vitro"

Mioblastos cardiacos en Gota pendiente. Fluorocromo DiOC₁ (3)

Las monocapas de mioblastos cardiacos obtenidas por cultivo en Gota pendiente ⁽¹¹⁾ y seleccionadas para el tratamiento fueron expuestas al volumen de 20 µL de CSL₅₀ de veneno crudo durante una hora (1h) a 37°C. Los controles fueron sometidos a igual volumen de solución Tyrodes. Transcurrido una hora (1h) del tratamiento fueron incubadas en solución DiOC₁ (3), durante 1 min, lavadas x 3 con solución Tyrode y montadas al microscopio invertido (Olympus IX71, USA) equipado con plancha térmica a 37°C, para la observación de la fluorescencia en células vivas con filtros de excitación Azul (D_{esc} AZUL). Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD DP71 y procesadas con Adobe Photoshop CS3 y PowerPoint (Microsoft Corporación, La preparación del Fluorocromo catiónico 3,3 dimetiloxicarbonocianida

(DiOC₁ (3) ⁽¹²⁾), fue realizada a partir de una solución madre, del producto Sigma, de 0,1 mg/mL. La solución de incubación fue preparada con una mezcla de 10 mL de solución Tyrode + 650 µL de solución madre.

Resultados

"In vivo".

Actividad cardiaca. Frecuencia Cardiaca Promedio (FCP).

El registro gráfico del VCG muestra la evolución de los cambios de luminosidad y el valor de FCP antes del tratamiento (Fig. 1a), representados como una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad en función del tiempo t(s). Particularmente, fueron registrados valores de FCP, alrededor $130 \pm 1,99$ Pulsaciones/minutos (P/min). En contraste, luego del tratamiento (Fig. 1a'), se presentó un registro irregular y poco homogéneo en secuencia de puntos máximos, con saltos arrítmicos, que se tradujo en una reducción en el valor de los intervalos máximos de luminosidad en función del tiempo. Particularmente, fueron registrados valores de FCP alrededor de $106,9 \pm 5,8$ Pulsaciones/minutos (P/min) La comparación entre las Fcp antes y después se tradujo en reducción significativa del 18% de la Fc embrionaria, en una población total de N=30 embriones en interacción aguda con el veneno crudo de *B. colombiensis*. El análisis de la región vascular embrionaria control (Fig.1b), en comparación con la del tratado (Fig.1b'), permitió determinar una respuesta angiogenica o incremento en la vascularización de la región respuesta al veneno.

Oxido-reducción del colorante vital Verde Janus.

La oxido reducción (oxi-red), del colorante vital Verde Janus antes del tratamiento se destaco en el área lumbar-torácico-embrionaria. Se observo, en el control (Fig.1c), un gradiente "oxi-red", azul-rosa (flechas), caracterizado por un mayor color azul en el área lumbar (al) y un mayor color rosa (r) en el área del tórax (at). En contraste, luego del tratamiento con el veneno crudo (Fig.1c'), se registro una perdida de la coloración azul (estado oxidado), del área lumbar (al) e intensificación del rosa (estado reducido), en el área del tórax (at). Acompañado el cambio en el gradiente de oxido reducción, se destacan núcleos hemorrágicos (flechas pequeñas).

Mioblastos cardiacos. Fluorocromo DiOC₁ (3)

La población de mioblastos cardiacos en cultivo primario de Gota pendiente mostró, a las 24 horas, homogeneidad, confluencia y un amplio halo de crecimiento (Fig.2a). Al ser tratados durante una hora (1h) con el veneno crudo de *B. colombiensis* (Fig.2b), se perdió la homogeneidad, la confluencia y la extensión del halo de crecimiento. Se presentó una disrupción de la monocapa de mioblastos cardiacos, asociada con la aparición de mayores espacios intercelulares. Los mioblastos cardiacos cambiaron su forma estrellada de amplio citoplasma, claros núcleos y nucleolos (Fig.2a'), a células de formas redondeadas, con estrecho citoplasma, finas extensiones citoplasmáticas, núcleos y nucleolos difusos (Fig.2b'). La población de mioblastos cardiacos controles incubados con DiOC₁ (3) (Fig.2a''), mostró un intenso brillo de fluorescencia emitida en verde. Se destacó, la estructura convencional de las mitocondrias con forma de bastones alargados por todo el citoplasma y en el área peri-nuclear (flechas). En contraste, los mioblastos tratados con el veneno crudo (Fig.2b''), presentaron una estructura celular colapsada, con intensa fluorescencia difusa, estructuras mitocondriales y área perinuclear sin definición alguna.

Discusión

El embrión de pollo "*in vivo*" e "*in vitro*", usado en la presente investigación, constituyó un modelo experimental que nos acercó al conocimiento de la acción cardiotoxica del veneno crudo de *B. colombiensis*. Particularmente, los resultados obtenidos "*in vivo*" reprodujeron, como respuesta primaria a la agresión del veneno, la actividad hemorrágica y angiogenica. Las señales encontradas han sido definidas como características del envenenamiento ofídico inducido por la familia Viperidae y han sido reportadas en otras investigaciones, en modelos de mamíferos ⁽¹³⁾. Respecto al origen de tales señales ⁽¹³⁾ cabe destacar, como ha sido demostrado por varios autores ⁽¹⁴⁾, que muy probablemente las mismas sean mediadas por la acción de Metaloproteasas presentes en los venenos botropicos ⁽¹⁵⁾. Otros autores han establecido la relación funcional y metabólica con la activación de sistemas enzimáticos de degradación como la vía de proteosoma-ubiquitina ⁽¹⁶⁾. Todas estas proteinasas conducen el daño tisular a través

de la degradación de componentes particulares de la matriz extracelular, que incluye laminita, nidogen y colágeno tipo IV ⁽¹⁷⁾. La degradación de componentes de matriz conduce también un proceso inflamatorio y un proceso de remodelación del tejido epitelial ⁽¹⁸⁾, llevado a cabo por la liberación de factores angiogénicos y células inflamatorias que explicarían la revascularización encontrada en nuestra experimentación. Una consecuencia de tal degradación sería la promoción de un deficiente estado de oxigenación, y de hipoxia tisular por falta de irrigación sanguínea, como consecuencia del acumulo de núcleos hemorrágicos, lo cual estaría generando un cambio en el gradiente fisiológico de oxido-reducción, alrededor del área cardíaca, detectado a través del colorante vital Verde Janus, que comprometería también la funcionalidad del órgano pulsátil, con la disminución en la frecuencia cardíaca observada. Por otra parte, los resultados obtenidos *"in vitro"*, permitieron vincular, a nivel celular, el aspecto metabólico de la acción cardiotoxica del veneno de *B. colombiensis* con las mitocondrias, orgánulos subcelulares, reconocidas como fuentes sustanciales en la homeostasis de especies reactivas de oxígeno en el organismo en general ⁽¹⁹⁾. Una alteración en la permeabilidad de las membranas mitocondriales, intervendría directamente con la homeostasis de las principales especies reactivas de oxígeno; tales como el H₂O₂ y oxido nítrico (ON), que interviene en el stress oxidativo. Cualquier agente que modifique las membranas celulares comprometería la homeostasis iónica y conduciría, a un proceso de muerte celular ^(20, 21). Dicha situación, ha sido puesta en evidencia a través de la redistribución de la fluorescencia, en los mioblastos cardíacos incubados con el fluorocromo DiOC₁ (3). Estos resultados permiten sugerir que probablemente el veneno de *B.colombiensis* pudiera estar promoviendo la activación de factores mitocondriales y otras vías constitutivas de muerte celular. En la actualidad, los conocimientos relativos a la cardiotoxicidad son limitados ⁽²²⁾; por lo que se hace necesaria la realización de nuevos estudios exhaustivos en esta área.

Agradecimiento

El presente trabajo ha sido soportado con el financiamiento del Proyecto Grupal del FONACIT. N° G-2005000400.

Fig.1 Efecto cardiotoxico del Veneno crudo de *B. colombiensis*, en modelo experimental de embrión de pollo *"in vivo"*. Registro de Videocardiograma (VCD). Fotogramas: antes (**a**) y después de una hora de tratamiento con CL₅₀ veneno crudo de *B.colombiensis* (**a'**). a) evolución de los cambios de luminosidad en el tiempo en segundos t (s), b) frecuencia cardiaca promedio (FCP) en pulsaciones / min (P/min) ± cada tres desviaciones Standard (3*sigma). Muestra poblacional N=30. Rápida respuesta angiogenica, con parcial revascularizacion en el área vascular embrionaria. Control (**b**) y tratado (**b'**). Gradiente de oxidorreducción (oxi-red), entre el área lumbar (al) y el área torácico (at), de embrión vivo, antes (**c**) y después (**c'**). Azul: colorante oxidado (oxi), Rosa: reducido (red). Se resalta los puntos hemorrágicos (flechas pequeñas). Microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, 2,5X.

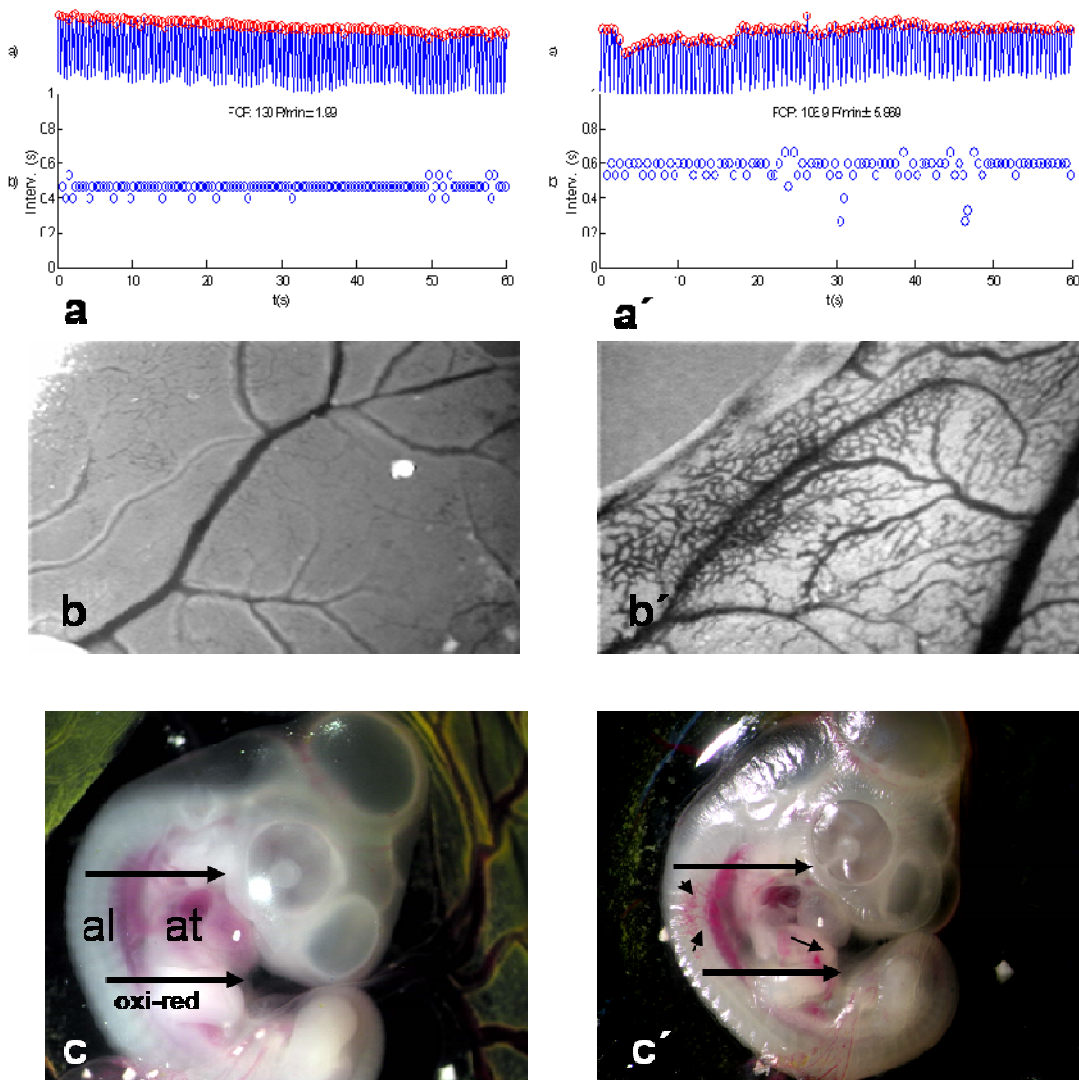
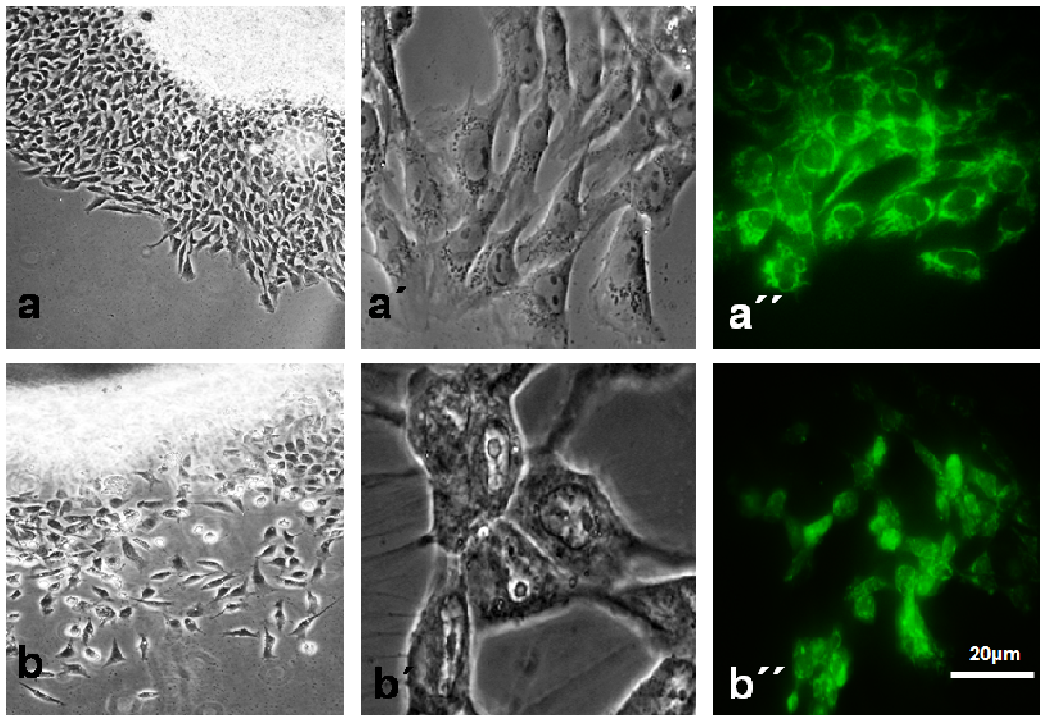


Fig.2. Efecto cardiotoxico del veneno crudo de *B colombiensis* en modelo experimental “*in vitro*” de mioblastos cardiacos cultivados en Gota pendiente. Registro en contraste de fase de monocapa de mioblastos, vivos, antes (**a**) y después (**b**) del tratamiento con CL₅₀ del veneno crudo de *B. colombiensis*. Mayor aumento a´ formas estrelladas y b´ células redondeadas y filamentos. (Mioblastos cardiacos incubados con DiOC1(3), un minuto (1´). Se resalta difusión de la fluorescencia antes (a´´) y después (b´´) del tratamiento. Barra=20µm.



Bibliografía

1. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim, Gottlieb JA. (1973). A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32: 302-314.
2. Kang YJ (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 109: 27-34.
3. Peters A, Liu E, Terrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J (2000). Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology*. 11: 11-17.
4. Girón, M.e., Salazar, A.M., Aguilar, I., Pérez, J. C., Sanchez, E.E., Arocha, C.L (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp.Biochem.Physiol.Toxicol Pharmacol*. 147: 113-121.
5. Gutiérrez JM, Núñez J, Díaz C, Cintra AC, Homs-Brandeburgo MI, Giglio JR. (1991) Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. [Exp Mol Pathol](#). Dec; 55(3):217-29.
6. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. (2000). Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*. Aug;82(8):755-63.
7. Nishibatake M, Nakazawa M, Tomita H, Ikeda K, Takao K. (1990). Image analysis of cardiac contraction in early stage of the chick embryo. *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*. Clark E, Takao A, eds. 22: 305-315.
8. Hodach, R. J., Gilbert, E.F., Fallon, J. F (1974). Aortic arch anomalies associated with the administration of epinephrine in chick embryos. *Teratology*. 9: 203-209.
9. Hamburger, V y Hamilton, H (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*. 195:231-272.
10. Raspotnig G, Fauler G, Jantschet W, Windischhofer K, Schachl K, Leis H. (1999). Colorimetric determination of cell numbers by Janus Green staining. *Analytical Biochemistry* 275: 74-83.

11. Alvarez M, Barasa A (1996). Efecto de D-carnitina sobre mioblastos cardiacos en cultivo primario. Arch.Venez.Farm.Terap. 15(1):37-42.
12. Poot, M. (1998). Staining of Mitochondria. En: Cell Biology: A Laboratory Handbook .Sec.Ed. Vol 2. Academy Press. Pp: 513-517.
13. Gallacci, M., Souza, F.A.D., Spencer, P., Rogero, J., Nascimento, N y Dal Pail-Silva, M. (2002). Co-gamma irradiation prevents *Bothrops jaracussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated Mouse neuromuscular junction. Toxicon 40: 1101-1106.
14. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Diaz C, Escalante T (2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon 54: 958-975.
15. Rodríguez-Acosta, A., Monterrey, F., Céspedes, G., Finol, H. J. (2003). Alteraciones estructurales y ultraestructurales del encéfalo ocasionados por veneno de la serpiente mapanare (*Bothrops colombiensis*). Rev Toxicol. 20:199-203.
16. Gonçalves, D.A., Silva, E.V., Graça, F.A., Lira, E.C., Zanon, N.M., Mendes, G.E., Burdmann, E.A., Migliorini, R.H., Kettelhut, I.C., Navagantes, L.C. (2008). In vivo effects of *Bothrops jaracussu* venom on metabolic profile and on muscle protein metabolism in rats. Am.J.Trop.Med. Hyg (1985): 771-778.
17. Bjarnason JB, Foz JW (1994). Haemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. Pharmacol Ther. 62: 325-372.
18. Jiménez N, Escalante T, Gutiérrez JM, Rucavado A (2008). Skin pathology induced by snake venoms metalloproteinase: Acute damage, revascularization and re-epithelization in Mouse ear model. J.Invest.Dermatology. 128: 2421-2428.
19. Khosravi RF, Esposti MD (2004). Death receptor signals to mitochondria. Cancer Biology & Therapy. 3; 11: 1051-1057.
20. Mathur A, Hong Y, Kemp BK, Barrientos AA, Erusalimsky JD (2000). Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in culture cardiomyocytes. Cardiovasc Res 46(1): 126-138).
21. Lemasters, J. J., Nieminen, a.L., Qian, T., Trost, L.C., Herman, B (1997). The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. Mol. Cell Biochem 174:159-165.

22. Sifuentes, N.D., El-Kik, C.Z., Hilmar, D.R., Tomaz, M. A., Strauch, A.M., Calil-Elias, s., Arruda, Z.E., Schwartz, F.E., Melon, A.P (2008). Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of Bothrops jararacussu venom. *Toxicon* 51: 28-36.

Recibido: 04/03/10

Aceptado: 10/03/10