

**EFFECTO DEL VENENO DE *Hadruides charcasus* SOBRE EL TEJIDO CARDIACO DE *Bufo spinulosus*****Effect of *Hadruides charcasus* venom on cardiac tissue of *Bufo spinulosus***

Zuñiga Julca Edwin <sup>1\*</sup>, Vargas Chávez Kenyo<sup>1</sup>, Vásquez Díaz Daniel<sup>1</sup>, Vásquez Mercedes Yrma<sup>1</sup>, Vilca Germán Esther<sup>1</sup>, Vigo Pereyra John<sup>1</sup>, Villanueva León Gesica<sup>1</sup>, Zavala Obando Sandi<sup>1</sup>, Zavaleta Guzmán Daniel<sup>1</sup>, Silva Correa Carmen<sup>2</sup>.

Recibido: 01 junio del 2014; Aceptado: 30 de Junio del 2014

**RESUMEN**

**Objetivo:** Determinar el efecto del veneno de *Hadruides charcasus* sobre tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. **Material y Método:** Se trabajó con 15 especímenes *Hadruides charcasus* de los que se extrajo el veneno mediante estimulación eléctrica a 22 voltios; se inoculó 0,2 mL de solución final del veneno por vía intraperitoneal. Se trabajó en kimógrafo, ligando el ápex del corazón para ver el comportamiento cardiovascular (fuerza de contracción) que ocasiona el veneno durante estenosis arterial, luego se sacrificó a los especímenes para extraer y conservar el corazón para estudios histopatológicos. **Resultados:** Se observó aumento de la amplitud cardíaca durante estenosis arterial pero no fue significativo ( $p = 0,398$ ). La frecuencia cardíaca se mantuvo constante ( $p = 0,982$ ). En el análisis histológico del corazón se observó necrosis celular, extravasación de sangre, infiltración leucocitaria, degeneración de fibras y lesión a nivel del endotelio. **Conclusiones:** El veneno de *Hadruides charcasus* aumentó la fuerza de contracción del tejido cardíaco, sin embargo, no fue estadísticamente significativo. Se evidenciaron alteraciones histológicas en tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*.

**Palabras clave:** Estenosis arterial, *Hadruides charcasus*, *Bufo spinulosus*.

**ABSTRACT**

The aim of this research was to determine the effect from *Hadruides charcasus* venom on cardiac tissue of *Bufo spinulosus*, **MATERIAL AND METHOD:** We worked with 15 specimens of *Hadruides charcasus*. Venom was extracted by electrical stimulation at 22 volts; 0.2 mL final venom solution was inoculated intraperitoneally. The heart was ligated to a kymograph to study the effect of poison on cardiovascular behavior during arterial stenosis, later the specimens were sacrificed to remove and retain the heart for histological studies. **RESULTS:** Increase in cardiac amplitude was observed during arterial stenosis but was not significant ( $p = 0.398$ ). Heart rate was kept constant ( $p = 0.982$ ). Histologic analysis showed cell necrosis, extravasation of blood, leukocyte infiltration, fiber degeneration and lesions in endothelium. **CONCLUSIONS:** *Hadruides charcasus* venom increased the force of contraction of cardiac tissue, however, was not statistically significant. The poison produced histological alterations in cardiac tissue of *Bufo spinulosus*.

**Key words:** *Hadruides charcasus*, *Bufo spinulosus*, arterial stenosis.

<sup>1</sup> Alumnos y <sup>2</sup>Docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

\*Autor para correspondencia: miguel.21z@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

Los escorpiones son los artrópodos más antiguos de nuestro planeta que habitan en regiones tropicales y subtropicales, incluso en ambientes áridos<sup>1</sup>.

En el Perú existen representantes de seis familias de escorpiones: *Bothriuridae*, *Buthidae*, *Euscorpiidae*, *Ischnurida* y *Caraboctonidaese*, se han descrito 34 especies dentro de las que destaca *Hadruioides charcasus*, que se encuentra en los departamentos de la costa norte del país como Tumbes, Piura, La Libertad y Cajamarca<sup>2</sup>.

El escorpión adulto mide entre 4 y 20 centímetros de longitud dependiendo de la especie. El cuerpo está formado por 3 segmentos: cefalotórax, abdomen o mesosoma y postabdomen, metasoma<sup>3</sup>. Químicamente el veneno de escorpión está constituido principalmente por proteínas, las cuales pueden ser toxinas o enzimas. Las toxinas de estos venenos se caracterizan por bloquear canales iónicos de sodio y potasio afectando directamente al sistema nervioso por lo que son las responsables de paralizar a las presas<sup>1</sup>.

A pesar de ser un grupo tan pequeño el escorpionismo es de carácter endémico y un problema de salud pública regionalizado, por lo cual, el estudio de su veneno adquiere trascendencia para establecer el cuadro de toxicidad de los escorpiones de importancia médica en el país<sup>4</sup>.

De acuerdo con la variedad e intensidad de los síntomas y para fines diagnósticos, terapéuticos y de pronóstico, se clasifica en leve, moderado y grave. Los casos más graves suelen observarse en los extremos de la vida: bebés, niños menores de 7 años y ancianos<sup>5</sup>.

Los cambios electrocardiográficos pueden ser observados al poco tiempo o en horas después de la picadura por escorpión, dentro de estas alteraciones están los trastornos del ritmo cardíaco: taquicardia sinusal, bradicardia sinusal, extrasístole ventricular, extrasístoles supraventriculares, taquicardia ventricular<sup>6</sup>.

La estenosis es la disminución del área valvular aórtica a partir de un punto crítico; genera una incapacidad para incrementar el gasto cardíaco y en determinadas condiciones, una caída neta del volumen minuto<sup>7</sup>.

En la especie *Hadruioides charcasus* se ha identificado la presencia de al menos 7 bandas proteicas con pesos moleculares de 5.2 KDa a 85.6 KDa, además el veneno de la especie presenta diferentes patrones electroforéticos relacionados al sexo y existe la presencia de un polimorfismo proteico significativo en esta población<sup>2</sup>.

Se han realizado estudios del veneno de *Hadruioides charcasus* mediante electroforesis y su efecto de tres grupos de fracciones en *Oryctolagus cuniculus* encontrándose un cuadro de neurotoxicidad local<sup>8</sup>.

Por todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del veneno de *Hadruioides charcasus* sobre tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*.

## PROBLEMA

¿Cuál es el efecto del veneno de *Hadruioides charcasus* sobre tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*?

## HIPÓTESIS

El veneno de *Hadruioides charcasus* aumenta la fuerza de contracción del tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Material biológico:

El veneno se obtuvo de 15 escorpiones de la especie *Hadruioides charcasus*, procedentes de Pedregal (Distrito de Simbal - Departamento de La Libertad).

18 especímenes de *Bufo spinulosus* provenientes de su hábitat natural Virú - La Libertad.

### Material, Equipos y Reactivos:

- ✓ **Material:** Guantes quirúrgicos, jeringas de 1ml (tuberculina), frascos de vidrio, viales esterilizados, frascos de plástico, hilo de seda, plancha de corcho para rana.
- ✓ **Equipos:** Kimógrafo, equipo de disección, Voltímetro.
- ✓ **Reactivos:** Agua destilada, NaCl 0,9% y formol 10%.

**Método:****Selección de especímenes:**

Se trabajó con 18 ejemplares de la especie *Bufo spinulosus* machos y hembras.

**Distribución de especímenes:**

- ✓ **Grupo blanco:** Constituido por 6 especímenes de la especie *Bufo spinulosus* a los cuales se les inoculó suero fisiológico.
- ✓ **Grupo problema I (estenosis):** Constituido por 6 especímenes de la especie *Bufo spinulosus* a los que se realizó estenosis.
- ✓ **Grupo problema II (veneno + estenosis):** Constituido por 6 especímenes de la especie *Bufo spinulosus* a los cuales previamente se les inoculó veneno de *Hadruroides charcasus* y luego se realizó estenosis.

**Captura e identificación de los escorpiones:**

Se capturó la especie en su hábitat natural, en áreas rurales de la localidad de Pedregal (distrito de Simbal - Departamento de La Libertad). Luego fueron trasladados al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y se mantuvieron a temperatura ambiente con la finalidad de adaptarlos al medio y concentrar su veneno. La identificación taxonómica de la especie se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, mediante la observación estereoscópica de acuerdo a las claves de identificación de especies y subespecies descritas en las Revistas Peruanas de Entomología<sup>8</sup>.

**Extracción del veneno escorpiónico:**

El veneno se recolectó al mes de obtenidos los especímenes mediante estimulación eléctrica a 22 voltios, previamente inmovilizados en una caja de tamaño apropiado. Para ello, el cuerpo del escorpión quedó dentro de la caja y el metasoma (o cola) fuera de ésta. El acúleo se introdujo en un vial esterilizado, se le fijó convenientemente y se procedió a estimularlo eléctricamente mediante electrodos de un polo, previo humedecimiento con solución salina fisiológica<sup>8</sup>.

**Dosis e inoculación del veneno escorpiónico:**

La dosis de veneno que se administró para la intoxicación fue el equivalente a dos glándulas del escorpión.

Se procedió a retirar los viales con veneno del equipo de criopreservación. El contenido de cada vial fue diluido con 0.1 mL de solución salina fisiológica y luego reunido en un solo frasco de vidrio esterilizado. Dicha solución se extrajo por completo con una jeringa de tuberculina y se llevó a 1 mL con solución salina fisiológica con el fin de homogenizar y estandarizar la dosis, de tal manera que se inoculó 0.2 mL de solución final por vía intraperitoneal a *Bufo spinulosus*.

La exposición al tratamiento en el grupo problema II fue de 60 minutos.

**Inmovilización, ubicación (en kimógrafo) del corazón de Bufo spinulosus y administración del veneno escorpiónico:**

Los especímenes (*Bufo spinulosus*) fueron descerebrados mediante un corte con una tijera detrás de los globos oculares. Una vez descerebrados los animales y pasado el efecto del traumatismo, se les colocó y fijó (con alfileres) en una plancha de corcho, en posición de cubito dorsal.

En la región precordial, se hizo un corte en triángulo para dejar descubierto el corazón y vasos arteriovenosos. La punta del corazón fue fijado con un ganchito de metal, que transmite la contracción del corazón (fuerza contráctil) mediante una palanca isométrica previamente calibrada al kimógrafo, el cual registró el comportamiento cardíaco del espécimen. Posteriormente se administró 0,1 mL de la solución final de veneno, de manera directa al tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. Se registraron los datos del comportamiento cardiovascular (amplitud y frecuencia cardíaca)<sup>9</sup>.

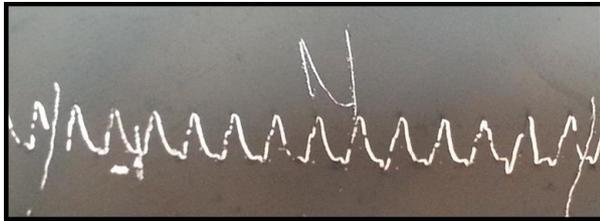
**Realización de Estenosis en el Grupo Problema II**

Con la finalidad de producir una obstrucción del flujo sanguíneo se procede a sujetar con hilos los extremos de la arteria aorta, y se ajusta por 30 segundos. Luego de ello se mide amplitud y frecuencia cardíaca.

**Análisis Histopatológico**

Posteriormente se realizó la fijación del tejido cardíaco, previo lavado con NaCl 10%, el objetivo de este paso es conservar el protoplasma con la menor alteración del tejido vivo por ello se efectuó a la mayor brevedad para evitar la digestión del tejido por las enzimas que se encuentran en él. La mayor parte de los líquidos fijadores coagulan el protoplasma para hacerlo insoluble, y endurecen el tejido para facilitar el corte. El reactivo que se empleó como agente fijador es la formalina (formol al 10%)<sup>8</sup>.

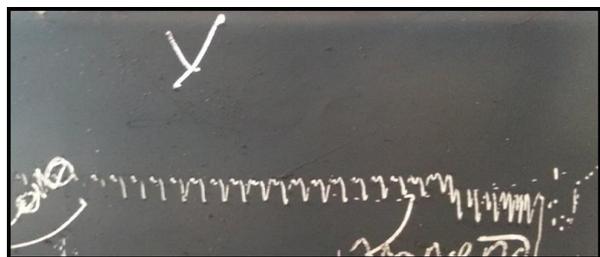
**RESULTADOS**



A. Frecuencia cardíaca de *Bufo spinulosus* en estado basal.



B. Frecuencia cardíaca de *Bufo spinulosus* durante periodo de estenosis arterial.

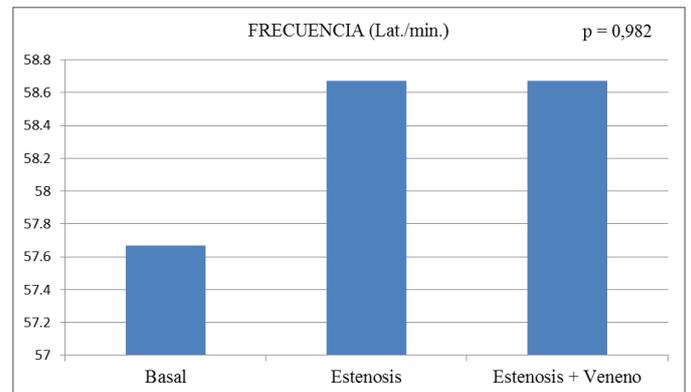


C. Frecuencia cardíaca de *Bufo spinulosus* durante el efecto del veneno de *Hadruioides charcasus* en el proceso de estenosis arterial.

**Figura 1.** Representación gráfica en kimógrafo, del comportamiento cardiovascular de *Bufo spinulosus*.

**Tabla 1.** Efecto del veneno de *Hadruioides charcasus* sobre la frecuencia cardíaca en el comportamiento cardiovascular de *Bufo spinulosus*.

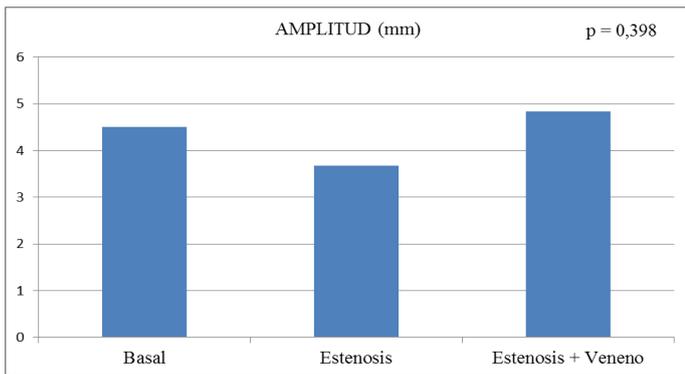
Estímulo	FRECUENCIA (Lat./min.)						$\bar{x}$
	Especimen						
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	
Blanco	60	42	60	56	68	60	57,67
Estenosis	60	44	48	60	72	68	58,67
Veneno + Estenosis	60	44	48	60	64	76	58,67



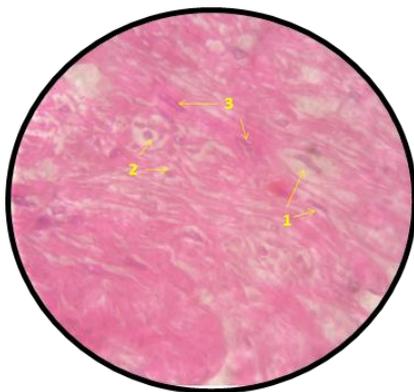
**Figura 2.** Efecto del veneno de *Hadruioides charcasus* sobre la frecuencia cardíaca de *Bufo spinulosus*.

**Tabla 2.** Efecto del veneno de *Hadruioides charcasus* en la amplitud de la contracción en corazón de *Bufo spinulosus*.

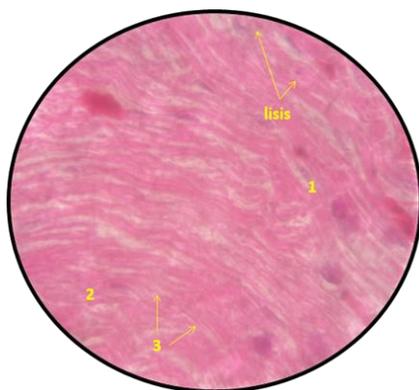
Estímulo	AMPLITUD (mm)						$\bar{x}$
	Especimen						
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	
Control	5	5	4	4	4	5	4,50
Estenosis	4	5	1	4	3	5	3,67
Veneno + Estenosis	5	6	1.5	6	3.5	7	4,83



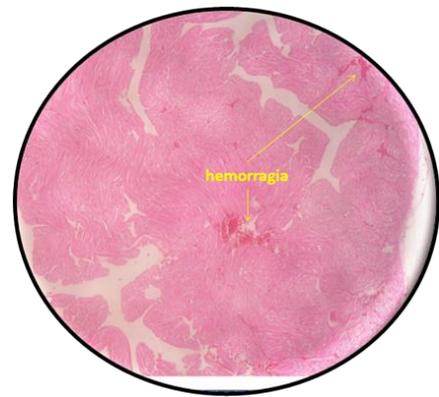
**Figura 3.** Efecto del veneno de *Hadruido charcasus* en la amplitud de contracción cardíaca de *Bufo spinulosus*.



**Figura 4.** Tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. Grupo Blanco. Musculatura cardíaca en corte longitudinal. Se reconocen los capilares en las mallas (1), núcleos intensamente coloreados corresponden a los fibrocitos (2), núcleos de las célula muscular cardíaca (3); características que le confieren aspecto normal. H&E. 400X



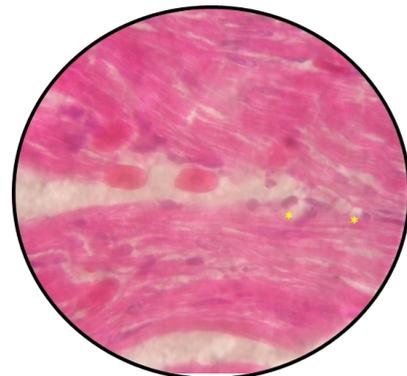
**Figura 5.** Tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. Grupo Problema I. Fibras musculares muchas sin la presencia de su núcleo central otras con lisis nuclear, hallazgo indicativo de muerte celular o necrosis. H&E. (1000X)



**Figura 6.** Tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. Grupo Problema I. Extravasación de sangre (hemorragia) entre el tejido conectivo. Indica lesión al endotelio capilar. H&E (100X)



**Figura 7.** Tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. Grupo Problema II. Moderada infiltración celular leucocitaria (migración desde los capilares) en respuesta a la agresión irritativa por el tejido muscular. H&E. (400X)



**Figura 8.** Tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*. Grupo Problema II. Degeneración de algunas fibras caracterizada por su aspecto vacuolar tumefacta o hinchada del citoplasma (\*), hallazgo por alteración del metabolismo del agua ante la agresión al tejido muscular. H&E. (400X)

## DISCUSIÓN

Los accidentes por escorpionismo en el norte del Perú están relacionados con representantes del género *Hadruidoidea*. El efecto del veneno radica en la presencia de neurotoxinas dirigidas a sitios específicos de la membrana citoplasmática, modificando así el comportamiento de los mecanismos de selección iónica imprescindible para la fisiología celular. La rapidez de estas toxinas se debe a que ellas son sumamente pequeñas y viajan en el torrente sanguíneo con mucha velocidad, hasta que llegan a su sitio de acción<sup>9</sup>.

En la evaluación del efecto del veneno de *Hadruidoidea charcasus* en el comportamiento cardiovascular (Fig. 1), durante estenosis arterial de *Bufo spinulosus*; en la Tabla 1 y Fig. 2 se observa que en los cuatro primeros especímenes, la frecuencia cardíaca no varía después de la estenosis; sin embargo, en el quinto y sexto espécimen se observa una disminución y aumento de la frecuencia cardíaca respectivamente. Estos efectos se deben a la acción de las neurotoxinas sobre las terminaciones nerviosas postganglionares de las ramas simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo, con liberación excesiva de catecolaminas y acetilcolina<sup>2,4,10</sup>.

Las respuestas adrenérgicas y colinérgicas pueden presentarse simultáneamente, este efecto antagónico explicaría que la frecuencia cardíaca en la mayoría de los especímenes se haya mantenido constante posterior a la estenosis arterial. Generalmente suelen aparecer primero los efectos colinérgicos, pero predominan las de tipo adrenérgico, sin embargo en el quinto espécimen se puede observar efecto colinérgico manifestando en una disminución de la frecuencia cardíaca y en el sexto espécimen se observa efecto adrenérgico manifestándose en un aumento de la frecuencia cardíaca<sup>2,8</sup>.

Con respecto a las amplitudes medidas, en todos los especímenes se observó un aumento de la amplitud (Tabla 2 y Fig. 3) lo cual está relacionado con la fuerza de contracción, este efecto es debido al estímulo de los receptores beta adrenérgicos cardíacos que aumentan la contractilidad del corazón. A pesar de evidenciarse un aumento de la fuerza

de contracción, este resultado no fue estadísticamente significativo ( $p = 0,398$ )<sup>2,7</sup>.

Del estudio efectuado sobre el veneno de *Hadruidoidea charcasus* en tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*, se tiene que, luego de sacrificar a los especímenes (a una hora de inoculado el veneno), se observó en los cortes histológicos (figura 7 y 8) extravasación de sangre (hemorragia) entre el tejido conectivo, lesión del endotelio capilar, moderada infiltración celular leucocitaria (migración desde los capilares) en respuesta a la agresión irritativa por el tejido muscular, degeneración de algunas fibras caracterizada por su aspecto vacuolar tumefacta o hinchada del citoplasma, hallazgo por alteración del metabolismo del agua ante la agresión al tejido muscular en comparación al tejido cardíaco de los especímenes del grupo problema I, en los que se observa congestión capilar producto de la respuesta inflamatoria, muerte celular o necrosis (Figura 5 y 6). Mientras que en el tejido del espécimen del grupo Blanco se observan las características normales histológicas, como núcleos intensamente coloreados corresponden a los fibrocitos (Figura 4).

En nuestro medio no existen trabajos relacionados con el veneno de *Hadruidoidea charcasus* en tejido cardíaco, pero se ha realizado trabajos de especies diferentes, en los cuales se ha observado efectos similares. Por ejemplo, en un estudio realizado por Rojas sobre el veneno de *Ttyus discrepans* (escorpiones, *Buthidae*), se observó cambios en la estructura del miocardio, áreas focales de tejido cardíaco fragmentado sin estriaciones, núcleos mostrando alteraciones y algunos vacuolizados<sup>11,12</sup>.

Estos hallazgos se deben a que el veneno (neurotoxinas de bajo peso molecular) actúa sobre canales iónicos dependientes de voltaje (principalmente,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en membranas excitables (tejido muscular cardíaco), modificando su permeabilidad iónica. Las neurotoxinas, además, liberan sustancias endógenas farmacológicamente activas como óxido nítrico, bradiquinina, histamina, factor activador plaquetario (PAF), factor aumentador de la permeabilidad capilar y citoquinas; estos mediadores químicos

incrementan el flujo sanguíneo tisular y modifican la permeabilidad endotelial, permitiendo la migración de los leucocitos hacia el sitio de la lesión; con respecto a la degeneración de fibras cardíacas es probable debido a la presencia de sustancias cardiotoxica dentro del componente proteico del veneno de *Hadruides charcasus*<sup>11</sup>.

## CONCLUSIONES

1. El veneno de *Hadruides charcasus* aumenta la amplitud y fuerza de contracción del tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*, sin embargo, no es estadísticamente significativo.
2. El veneno de *Hadruides charcasus* produce alteraciones histológicas en el tejido cardíaco de *Bufo spinulosus*; mostrando extravasación de sangre, infiltración leucocitaria, degeneración de fibras y lesión a nivel del endotelio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tincopa L. Estudio bioquímico del veneno del escorpión *Tityus sp.* [tesis] Lima: UNMSM. 2012. [Fecha de acceso: 17/04/2014]. Disponible en: [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/estudio-bioquimico-veneno-escorpion-tityus-sp-aff-t-silvestris-pocock/id/51070257.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/estudio-bioquimico-veneno-escorpion-tityus-sp-aff-t-silvestris-pocock/id/51070257.html)
2. Martínez V. Noriega C. Efectos histopatológicos agudos del veneno de escorpión (*Buthidae: T. Caripitensis*) en miocardio de ratones en presencia de atropina. Bolívar. 2010. [Fecha de acceso: 17/04/2014]. Disponible en: <http://ri.bib.udo.edu.ve/bitstream/123456789/2851/1/02Tesis.%20Efectos%20Histopatologicos%20Agudos.pdf>
3. Charry R. Accidentes por picadura de escorpión. Bogotá. 2006. [Fecha de acceso: 17/04/2014]. Disponible en: <http://praxisconsors.org/files/Charry-AccidentesPorPicaduraDeEscorpion.pdf>
4. Barona J. Aspectos toxicológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Colombia. 2004. [Fecha de acceso: 17/04/2014].
5. Rojas Y. Cambios histológicos agudos causados por el veneno de *Tityus discrepans* (scorpiones, buthidae) en tejido cardíaco de ratones c57bl/6. Barcelona. 2013. [Fecha de acceso: 17/04/2014]. Disponible en: <http://ri.biblioteca.udo.edu.ve/bitstream/123456789/4431/1/Tesis.tityus.zulianus.cardiopulmonar.pdf>
6. Pérez O. Patrón electroforético de proteínas del veneno de escorpión *Hadruides charcasus*. Universidad Señor de Sipán. Chiclayo. 2013. [Fecha de acceso: 17/04/2014].
7. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humana. 4ª ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p. 423-27.
8. Repetto M. Repetto G. Toxicología fundamental. 4ª ed. España: Díaz de Santos; 2009. p. 312-15.
9. Díaz P. Alteraciones electrocardiográficas en pacientes de 5 a 14 años de edad picados por escorpión. [tesis] México: Universidad de Colima. 1999.
10. Chambers J. Exercise testing to stratify risk in aortic stenosis. Eur Heart J 2005; 26:1309-13. [Fecha de acceso: 20/05/2014]. Disponible en: [www.sac.org.ar/files/files/75-4-24.pdf](http://www.sac.org.ar/files/files/75-4-24.pdf)
11. Castro M, Gómez M. Efecto de tres grupos de fracciones proteicas del veneno de *Hadruides charcasus* en *Oryctolagus cuniculus*. [tesis] Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2002.
12. Díaz L, Torres J. Compendio de Ciencias Fisiológicas. Universidad Autónoma de Yucatán. 2012 [fecha de acceso: 06/07/2014]. p. 53-56. Disponible en: <http://www.medicina.uady.mx/principal/sgc2011/pdf/formatos/lfis/proc3/M-FMED-LFIS-01.pdf>