

# Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes

José María Gutiérrez y Luis Cerdas

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(Recibido para su publicación el 23 de abril de 1984)

**Abstract:** Biochemically and pharmacologically, myotoxins isolated from snake venoms can be placed in four main groups: myotoxic phospholipases A, low molecular weight basic toxins, cardiotoxins, and hemorrhagic myotoxins. The myotoxic phospholipases A notexin, taipoxin, crototoxin, and *Bothropsasper* myotoxin induce muscle necrosis by first affecting the integrity of the plasma membrane, thereby inducing a calcium influx that culminates in cell death. The small basic myotoxin crotamine acts on the voltage-sensitive sodium channels of skeletal muscle sarcolemma, inducing a sodium influx which is responsible for depolarization and contraction of skeletal muscle, as well as for vacuolization of sarcoplasmic reticulum. Cardiotoxins are basic membrane-active polypeptides that disorganize the structure of membranes; the myotoxic activity of cardiotoxins results from their ability to disrupt skeletal muscle sarcolemma. Finally, two hemorrhagic toxins (hemorrhagic toxin *b* and viriditoxin) are myotoxic; apparently, they induce myonecrosis secondarily to ischemia which develops in muscular tissue as a consequence of the hemorrhagic action of these toxins.

Una gran cantidad de venenos de serpientes inducen necrosis de músculo esquelético (Homma y Tu, 1971; Gutiérrez y Chaves, 1980; Mebs *et al.*, 1983). En los últimos años varias miotoxinas han sido aisladas de estos venenos, habiendo sido investigado el mecanismo de acción de algunos de estos componentes. Este tipo de estudio es significativo puesto que la comprensión más adecuada del modo de acción de las miotoxinas puede contribuir al desarrollo de métodos de tratamiento más eficaces y convertir estas miotoxinas en útiles instrumentos en el estudio de fenómenos celulares básicos cuyos detalles se desconocen. Por ejemplo, se está usando la crotamina, aislada del veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* (Laure, 1975) en el estudio de los canales de sodio de las células del músculo esquelético (Chang y Tseng, 1978). En el presente trabajo se revisan los avances en el estudio del mecanismo de acción de estas miotoxinas y se discuten algunas hipótesis al respecto.

Las investigaciones efectuadas permiten dividir las miotoxinas aisladas de venenos de serpientes en cuatro grupos, tomando en cuenta tanto criterios bioquímicos como farmacológicos: (1) Fosfolipasas A miotóxicas, presentes en muchos venenos de especies ubicadas en las

familias Elapidae, Hydrophiidae y Crotalidae (Harris *et al.*, 1980); (2) un grupo de toxinas básicas de bajo peso molecular presentes en los venenos de algunas serpientes cascabel (género *Crotalus*) (Tu, 1982); (3) cardiotoxinas, que son un grupo de polipéptidos básicos presentes en algunos venenos elapídeos (Karlsson, 1979) y (4) algunas toxinas hemorrágicas capaces de inducir mionecrosis, que pueden ser denominadas "miotoxinas hemorrágicas" (Ownby *et al.*, 1978; Fabiano y Tu, 1981). De estos cuatro grupos el que más ha sido investigado es el de las fosfolipasas A miotóxicas; sin embargo, la información obtenida con relación a los otros tres grupos permite proponer algunas ideas sobre su mecanismo de acción.

**Fosfolipasas A miotóxicas:** Varias miotoxinas con actividad fosfolipolítica han sido aisladas y caracterizadas a partir de una serie de venenos. Pese a que tienen en común la miotoxicidad y el efecto enzimático, entre ellas existen muchas diferencias estructurales y funcionales (Harris *et al.*, 1980). Algunas son neurotoxinas muy potentes, tales como la notexina (Karlsson *et al.*, 1972), la taipoxina (Fohlman *et al.*, 1976), la crotoxina (Habermann y Breithaupt, 1978) y la toxina mojave (Cate y Bieber, 1978; Gopalakrishnakone *et al.*, 1980).

Sin embargo, otras como la miotoxina de *Bothrops asper* no poseen efecto neurotóxico significativo (Gutiérrez *et al.*, 1984a). Desde el punto de vista estructural, muchas de estas miotoxinas se componen de una sola cadena de aminoácidos (por ejemplo, la notexina; Karlsson *et al.*, 1972), en tanto que otras como la crotoxina y la toxina mojave constan de dos subunidades de polipéptidos, una de las cuales presenta efecto tóxico y actividad fosfolipasa, mientras que la otra subunidad no es tóxica por sí misma y juega el rol farmacológico de molécula "chaperona" (Habermann y Breithaupt, 1978). Más aún, la taipoxina se compone de tres subunidades (Fohlman *et al.*, 1976).

Se ha estudiado el mecanismo de acción de cuatro de estas toxinas: la notexina del veneno de la serpiente australiana *Notechis scutatus*, la taipoxina de la serpiente australiana *Oxyuranus scutellatus*, la crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* y la miotoxina aislada del veneno de la terciopelo, *Bothrops asper*. Con base en estos estudios es posible obtener algunas conclusiones de tipo general.

Harris *et al.* (1975) observaron cambios patológicos en células musculares durante las primeras horas posteriores a la inoculación de 2 µg de notexina en ratas. Las lesiones más tempranas consisten en rupturas focales de la membrana plasmática de las células musculares y en hipercontracción de los miofilamentos. Aproximadamente de 3 a 6 horas posteriores a la inoculación las células necróticas fueron invadidas por un infiltrado de células fagocíticas. Simultáneamente, el "peso húmedo" del músculo aumentó como resultado del edema. A consecuencia de la destrucción de las fibras musculares, los niveles séricos de la enzima creatina quinasa (CK) se elevaron (Pluskal *et al.*, 1978). En contraste con lo drástico de su efecto miotóxico, la notexina no causó alteraciones morfológicas en vasos sanguíneos ni en nervios periféricos (Harris y Johnson, 1978).

Harris y MacDonell (1981) demostraron la presencia de lisolecitina mediante cromatografía de capa fina en extractos de músculo inoculado con notexina, lo que sugiere que la toxina tiene efecto fosfolipolítico no sólo *in vitro*, sino que también es capaz de hidrolizar fosfolípidos *in vivo*. Además, propusieron que el modo de acción de la notexina se basa en su capacidad para degradar enzimáticamente los fosfolípidos de la membrana plasmática de

las células musculares. Este fenómeno originaría una alteración severa en los mecanismos de regulación de la permeabilidad de la membrana hacia diferentes iones y macromoléculas.

Harris y Maltin (1982) estudiaron el desarrollo de lesiones musculares a consecuencia de inoculaciones de la taipoxina en ratas; observaron alteraciones ultraestructurales una hora después de administrada la toxina; la membrana plasmática mostró rupturas en algunos puntos, en tanto que la membrana basal se mantuvo intacta. Las miofibrillas perdieron su integridad estructural y se observó hipercontracción de los miofilamentos. Un infiltrado de células fagocíticas apareció a partir de la sexta hora y se hizo más pronunciado posteriormente. Por otra parte, el potencial de membrana de las células musculares disminuyó considerablemente a consecuencia del efecto de la taipoxina. Harris y Maltin (1982) propusieron que esta toxina actúa a nivel de la membrana plasmática, hidrolizando enzimáticamente algunos de sus componentes fosfolipídicos y alterando la permeabilidad hacia iones y macromoléculas. Dado que la taipoxina es una fosfolipasa A, estos autores sugirieron que la acción miotóxica se debe a la actividad fosfolipolítica de la toxina *in vivo*.

Gopalakrishnakone *et al.* (1984) describieron cambios patológicos 4-6 horas después de la inoculación de crotoxina en músculo de ratón. Inicialmente observaron lesiones subsarcolémicas localizadas en las que los miofilamentos estaban alterados y formaban masas densas amorfas; la membrana plasmática estaba interrumpida en algunas porciones y las mitocondrias se mostraban hinchadas. Posteriormente, las lesiones se hicieron más generalizadas y a las 24-48 horas se observó que las mitocondrias contenían depósitos densos con una alta concentración de calcio, de acuerdo con el microanálisis de rayos X. Gopalakrishnakone *et al.* (1984) demostraron que estos cambios patológicos son inducidos tanto por la crotoxina como por la subunidad con actividad de fosfolipasa A; sin embargo, si la molécula es modificada químicamente de tal manera que la actividad enzimática disminuya drásticamente, el efecto miotóxico desaparece casi por completo. Estos autores concluyeron que el sitio primario de acción de la crotoxina en músculo es la membrana plasmática y que es muy factible que esta acción esté relacionada con la hidrólisis de fosfolípidos.

Recientemente, una fosfolipasa miotóxica básica con peso molecular de 10.700 daltons fue aislada del veneno de *Bothrops asper* de Costa Rica (Gutiérrez *et al.*, 1984a). Una vez inoculada en músculo de ratón esta toxina induce lesiones degenerativas rápidamente que culminan con la muerte de la célula muscular. Inicialmente las células necróticas mostraron densas masas de miofilamentos que habían perdido la estructura sarcomérica normal. Posteriormente los miofilamentos fueron redistribuidos en el espacio celular, adquiriendo las células necróticas un aspecto hialino (Gutiérrez *et al.*, 1984a; 1984b). Las siguientes observaciones sugieren que esta miotoxina afecta inicialmente la integridad de la membrana plasmática y que los cambios patológicos posteriores son una consecuencia de esta acción inicial.

La miotoxina de *B. asper* induce un aumento rápido en los niveles plasmáticos de creatina quinasa (CK) (Gutiérrez *et al.*, 1984a). El hecho de que esta proteína citoplasmática difunda el espacio extracelular sugiere la presencia de lesiones en la membrana. Por otra parte, la toxina induce un rápido aumento de la concentración de calcio en el citoplasma (Gutiérrez *et al.*, 1984a), que probablemente se debe a un aumento en la permeabilidad de la membrana para este catión, originándose un rápido influjo de calcio con el correspondiente aumento de los niveles intracelulares. Algunos experimentos efectuados con verapamil, una droga que bloquea los canales de calcio, demostraron que el influjo observado no ocurre a través de estos canales (Gutiérrez *et al.*, 1984a). Es muy factible, por lo tanto, que este influjo ocurra como consecuencia de una alteración más generalizada en la membrana plasmática y no debido a una acción selectiva sobre los canales de calcio.

A nivel histológico, los primeros daños que se observan en las células musculares consisten en lesiones localizadas en la periferia celular. Estas lesiones tienen una forma triangular en la que la base está ubicada en la periferia y el vértice orientado hacia el interior de la célula (Gutiérrez *et al.*, 1984a, 1984b). Estas alteraciones han sido denominadas "lesiones delta" (Mokri y Engel, 1975) y en algunos casos se observaron varias de ellas en la misma célula. Esto reviste especial importancia puesto que lesiones similares han sido descritas en una serie de enfermedades musculares. Por ejemplo, las "lesiones delta" son características de los

estadios tempranos de degeneración celular en la distrofia muscular de Duchenne (Mokri y Engel, 1975); también han sido observadas experimentalmente después de inoculaciones de sustancias con acción detergente como Triton X-100, deoxicolato y lisolecitina (Pestronk *et al.*, 1982). Se ha demostrado que estas lesiones representan áreas de degeneración en las cuales la membrana plasmática ha sido parcial o totalmente destruida y, como consecuencia, un área limitada de la célula degenera. El hecho de que lesiones delta existan en células musculares 30 minutos después de la inoculación de la miotoxina de *B. asper* sugiere que la alteración de la membrana celular es un evento muy temprano que precede a las alteraciones observadas en las otras organelas celulares. Cuando estas lesiones fueron estudiadas con el microscopio electrónico de transmisión, efectivamente se comprobó que en estas áreas la membrana plasmática estaba parcial o totalmente ausente (Gutiérrez *et al.*, 1984b).

Por otra parte, estudios con cromatografía de capa fina demostraron que la miotoxina de *B. asper* hidroliza los fosfolípidos del tejido muscular (Gutiérrez *et al.*, 1984a). Muestras de músculo esquelético obtenidas 30 minutos después de la inoculación de la miotoxina contenían cantidades significativas de lisolecitina, lo que sugiere que la miotoxina presenta actividad fosfolipolítica *in vivo*. Lo anterior puede relacionarse con el modo de acción de la miotoxina de dos maneras: (1) la degradación enzimática de los fosfolípidos puede afectar drásticamente la integridad de la membrana plasmática y (2) la lisolecitina que resulta de la acción fosfolipolítica puede inducir un efecto tóxico por sí misma debido a sus propiedades detergentes. En este sentido, Pestronk *et al.* (1982) demostraron que inoculaciones de lisolecitina producen lesiones en células musculares que son similares a las lesiones observadas después de inoculaciones de la miotoxina de *B. asper*.

Las anteriores consideraciones permiten sugerir que la miotoxina de *B. asper*, así como la notexina, la taipoxina y la crotoxina, afectan inicialmente la integridad de la membrana plasmática y que los cambios patológicos descritos en las células musculares son una consecuencia de esa acción a nivel de membrana. Lo que aún no ha sido debidamente dilucidado es el rol que juega la actividad fosfolipasa de estas to-

xinas en la miotoxicidad; los resultados comentados favorecen la hipótesis de que es necesaria la actividad fosfolipolítica, aunque es necesario acumular más evidencias experimentales al respecto.

¿Cuáles son los efectos inmediatos de esta alteración en la integridad de la membrana? Quizá el efecto más significativo se relaciona con la pérdida del control de la permeabilidad al ion calcio. Al ser destruida la membrana, el calcio difunde al interior de la célula debido a la presencia de un pronunciado gradiente electroquímico que existe entre los fluidos intra- y extracelulares. En los últimos años se ha propuesto repetidamente que un aumento en la concentración citoplasmática del calcio es el evento decisivo en el proceso de muerte celular (Schanne *et al.*, 1979; Farber, 1981; 1982; Trump *et al.*, 1981).

En músculo esquelético un aumento en los niveles de calcio resulta en: (1) hipercontracción de los miofilamentos; (2) daño a las mitocondrias, debido a que estas organelas tienden a acumular calcio activamente; como consecuencia, las mitocondrias inicialmente aumentan de volumen y luego degeneran funcional y morfológicamente (Wrogemann y Pena, 1976; Publicover *et al.*, 1977); (3) activación de proteasas calcio-dependientes. Cabe destacar la "proteasa neutra activada por calcio" (CANP), que selectivamente hidroliza los componentes de la línea Z de las miofibrillas, dejando relativamente intactos los otros componentes (Ishiura, 1981); y (4) activación de fosfolipasas calcio-dependientes. Trump *et al.* (1981) han sugerido que estas fosfolipasas endógenas son responsables de la degradación posterior de la membrana plasmática, así como del retículo sarcoplásmico y mitocondrias.

Engel y Biesecker (1982) sugirieron que el complemento está también involucrado en el daño celular una vez que la membrana ha sido alterada al lograr demostrar, mediante técnicas inmunológicas, la presencia del complejo C5b-9 en el interior de las células musculares necróticas en biopsias de pacientes con diversas enfermedades musculares. Este hallazgo sugiere que el complemento es activado en el transcurso del proceso degenerativo, posiblemente como consecuencia del contacto de los componentes del complemento con algunas sustancias intracelulares. Independientemente del mecanismo de activación, la presencia del complejo C5b-9 indica que éste es un elemento

potencial que contribuye a alterar aún más las membranas celulares.

Algunos autores (Ng y Howard, 1980) han propuesto que fosfolipasas miotóxicas como la de *Enhydrina schistosa* y la notexina actúan a nivel del retículo sarcoplásmico. Teóricamente, una toxina de este tipo podría penetrar en la célula muscular y afectar membranas intracelulares tales como las del retículo sarcoplásmico y las membranas mitocondriales. Si éste fuera el mecanismo de acción de estas toxinas se podría predecir que las lesiones iniciales no serían las "lesiones delta", sino que primero existirían focos internos de degeneración como consecuencia de la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico o de las mitocondrias. Sin embargo, en el caso de la miotoxina de *B. asper*, la presencia de "lesiones delta" y los tempranos daños ultraestructurales observados en la membrana plasmática hacen muy difícil sostener la hipótesis de que el sitio primario de acción es el retículo sarcoplásmico.

Los estudios mencionados han demostrado que las fosfolipasas miotóxicas actúan muy rápidamente una vez inoculadas (Harris *et al.*, 1980; Gutiérrez *et al.*, 1984a) por lo que el rápido desarrollo de los eventos degenerativos dificulta considerablemente el éxito del tratamiento seroterápico. Gutiérrez *et al.* (1981) demostraron que, aunque el suero antiofídico es capaz de neutralizar el efecto miotóxico del veneno de *B. asper* cuando suero y veneno se incuban previo a su inoculación, el suero es parcialmente ineficaz cuando se administra después del envenenamiento. Resultados similares fueron obtenidos por Harris y Johnson (1978) con la notexina. Esto se debe a que la mionecrosis se desarrolla antes de que exista suficiente cantidad de anticuerpos en el tejido.

**Miotoxinas básicas de bajo peso molecular en algunos venenos de serpientes cascabel (*Crotalus* sp):** Aparentemente ésta es una familia de toxinas presentes solamente en especies del género *Crotalus*. La primera que se aisló fue la crotamina del veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* (Laure, 1975). Posteriormente Cameron y Tu (1977) aislaron la miotoxina *a* del veneno de *Crotalis viridis viridis* y demostraron que presenta una gran homología estructural y funcional con la crotamina (Cameron y Tu, 1978). Las estructuras primarias de la crotamina (Laure, 1975) y de

la miotoxina *a* (Fox *et al.*, 1979) han sido dilucidadas. Recientemente se ha aislado toxinas similares de los venenos de *C. viridis helleri* (Russell *et al.*, 1978), *C. durissus durissus* (Odell *et al.*, 1983), *C. viridis concolor* (Engle *et al.*, 1983) y *C. adamanteus* (Mebs *et al.*, 1983). Estructuralmente todas estas miotoxinas presentan características similares: son polipéptidos básicos de peso molecular entre 4000 y 5000 daltons.

La crotamina induce contracción del músculo esquelético tanto *in vitro* como *in vivo* (Cheymol *et al.*, 1971; Chang y Tseng, 1978; Vital-Brazil *et al.*, 1979). En un detallado estudio farmacológico, Chang y Tseng (1978) observaron que la crotamina induce una despolarización del potencial de membrana de las células musculares y un influjo de sodio; por otra parte, tanto la tetrodotoxina (un bloqueador de los canales de sodio) como la disminución de la concentración extracelular de sodio previenen esta despolarización. Chang y Tseng (1978) sugirieron que la crotamina actúa en los canales de sodio de la membrana plasmática de las células musculares induciendo un influjo de este catión.

Estos hallazgos ubican a la crotamina en un grupo de toxinas animales, vegetales y microbianas que actúan en los canales de sodio y que han sido estudiadas minuciosamente. Caterall (1980) clasificó estas toxinas en tres grupos: (I) Tetrodotoxina y saxitoxina, que bloquean el flujo de sodio y evitan el desarrollo de potenciales de acción; (II) moléculas liposolubles policíclicas, tales como batrocotoxina, grayanotoxina, aconitina y veratridina, que causan activación persistente de los canales de sodio al cambiar la sensibilidad del canal hacia el voltaje; estas toxinas también inhiben la inactivación de estos canales; (III) toxinas polipeptídicas como las presentes en los venenos de escorpiones y anémonas de mar que alteran el proceso de inactivación de los canales de sodio, a la vez que potencian la acción de las toxinas del grupo (II). Algunas investigaciones recientes (Chang *et al.*, 1983; Hong y Chang, 1983) posibilitan la ubicación de la crotamina en el contexto de esta clasificación general.

Los estudios de Chang *et al.* (1983) y Hong y Chang (1983) indicaron que: (1) no existe un efecto competitivo, en términos de unión al receptor, entre crotamina y tetrodotoxina o

entre crotamina y toxinas ubicadas en el grupo (II; aconitina, grayanotoxina, veratridina y batrocotoxina); (2) la crotamina afecta alostéricamente la unión de las toxinas del grupo II con sus receptores, ya que cuando las preparaciones son tratadas con crotamina, la afinidad de las toxinas del grupo II por sus receptores aumenta considerablemente; y (3) el receptor para la crotamina tiene cierta similitud con el receptor de algunas toxinas del grupo III. Por ejemplo, los receptores para crotamina y una toxina del escorpión *Leiurus quinquestriatus* muestran cierto grado de superposición, en tanto que los sitios receptores para crotamina y la toxina de la anémona *Anemonia sulcata* no se superponen, indicando que posiblemente corresponden a regiones moleculares diferentes en el canal de sodio (Chang *et al.*, 1983). Estos resultados sugieren que la crotamina se une a un receptor ubicado en la vecindad de los receptores para las toxinas del grupo III en los canales de sodio de las células musculares, alterando sus características e induciendo un influjo de sodio que provoca despolarización y contracción de las células musculares.

La acción de la miotoxina *a* en músculo esquelético ha sido estudiada desde un punto de vista patológico (Ownby *et al.*, 1976; 1982). Una vez inoculada intramuscularmente, la miotoxina *a* induce contracción del músculo esquelético acompañada de una pequeña elevación en los niveles plasmáticos de la enzima creatina quinasa (CK), pero no de alteraciones morfológicas en las células musculares (Ownby *et al.*, 1982). Los primeros cambios patológicos consisten en dilatación y vacuolización del retículo sarcoplásmico y del espacio perinuclear (Ownby *et al.*, 1976). El tamaño de las vacuolas aumenta, llegando a un máximo a las 24 horas. Las vacuolas se reducen de tamaño y se observan rupturas en la estructura de los miofilamentos, así como una serie de fenómenos degenerativos que culminan con la muerte de la célula muscular (Ownby *et al.*, 1976). Durante el período en que el retículo sarcoplásmico está dilatado, ocurre también un aumento en los niveles plasmáticos de la enzima creatina quinasa (CK) (Ownby *et al.*, 1982). Estudios ultraestructurales indican que no ocurren focos de ruptura en la membrana plasmática; sin embargo, el hecho de que exista un eflujo de creatina quinasa hacia el espacio extracelular sugiere que la permeabilidad de la membrana está alterada.

Pese a que no se han efectuado estudios

farmacológicos con la miotoxina *a*, se sugiere que el modo de acción de esta toxina es similar al de la crotamina. El fenómeno de vacuolización puede ser explicado si la miotoxina *a* actúa en los canales de sodio, induciendo un influjo de este ion al interior de la célula; este movimiento iónico se vería acompañado de difusión de agua, lo que originaría la vacuolización. Cuando ocurren alteraciones en la regulación del volumen celular en diversos tipos de fenómenos patológicos, el retículo sarcoplásmico acumula el exceso de fluido como parte de una serie de mecanismos compensatorios, como ha sido observado por Ginn *et al.* (1968) en tejido renal. La crotamina también induce vacuolización de las células musculares (Cameron y Tu, 1978), lo cual apoya la hipótesis de que ambas toxinas tienen un mecanismo de acción similar.

**Cardiotoxinas:** Las cardiotoxinas son un grupo de polipéptidos básicos presentes en algunos venenos elapídeos (Karlsson, 1979). Estas toxinas inducen una gran variedad de efectos farmacológicos, tales como hemólisis directa y contracción del músculo esquelético; además, poseen efectos cardiotoxicos y citotóxicos (Mebs, 1978; Chang, 1979). Los estudios efectuados por Duchon *et al.* (1974) demostraron que la fracción cardiotoxica del veneno de mamba, *Dendroaspis jamesoni*, induce mionecrosis en ratón. Es posible que esta actividad miotóxica esté presente en otras cardiotoxinas.

Bioquímicamente, las cardiotoxinas presentan cierta similitud con las neurotoxinas de acción post-sináptica aisladas de venenos elapídeos. Sin embargo, las cardiotoxinas contienen una mayor cantidad de lisinas y de aminoácidos hidrofóbicos (Karlsson, 1979). En lo relativo al efecto miotóxico, Duchon *et al.* (1974) observaron células musculares necróticas 30 minutos después de la inoculación de la cardiotoxina del veneno de *Dendroaspis jamesoni*. Ultraestructuralmente, estos autores describieron una serie de alteraciones como ruptura de la membrana plasmática, desaparición de la línea Z, dilatación del retículo sarcoplásmico, cambios en las mitocondrias y desorganización de las miofibrillas.

Diversos estudios bioquímicos señalan que las cardiotoxinas actúan a nivel de membranas. Se ha propuesto que inicialmente estas toxinas se unen a las membranas mediante fuerzas

electrostáticas no covalentes; posteriormente, la porción hidrofóbica de la toxina penetra la matriz lipídica de la membrana y ello trae como consecuencia la pérdida de la organización macromolecular de la membrana (Klibansky *et al.*, 1968). Algunas observaciones experimentales corroboran esta hipótesis; por ejemplo, la interacción de cardiotoxinas con membranas trae como consecuencia la pérdida del comportamiento termotrópico que caracteriza a las membranas biológicas (Dufourcq *et al.*, 1982). Además, estudios ultraestructurales de criofractura han demostrado la presencia de alteraciones drásticas en la estructura de las membranas a consecuencia de la acción de las cardiotoxinas (Gulik-Krzywicki *et al.*, 1981).

Si se acepta que las cardiotoxinas son capaces de alterar estructural y funcionalmente las membranas debido a la interacción de una porción hidrofóbica de la toxina con la matriz lipídica de las membranas biológicas, entonces es posible explicar las consecuencias patológicas de esta interacción en las células del músculo esquelético. Al perder la membrana la capacidad para regular la permeabilidad de iones y macromoléculas se daría un influjo de calcio que activaría una serie de mecanismos degradativos que ya fueron mencionados. Cabe mencionar que las alteraciones morfológicas descritas en músculo esquelético a consecuencia de la acción de la cardiotoxina (Duchon *et al.*, 1974) son muy similares a las observadas en músculo inoculado con las fosfolipasas miotóxicas (Harris *et al.*, 1980; Gutiérrez *et al.*, 1984b). Esta coincidencia puede ser explicada por el hecho de que, pese a que el mecanismo molecular de acción de estos dos grupos de miotoxinas es diferente, el resultado de su acción es similar, esto es, una alteración drástica en la membrana plasmática.

**Miotoxinas hemorrágicas:** Los venenos de serpientes de las familias Viperidae y Crotalidae contienen toxinas hemorrágicas (Ohsaka, 1979). Estudios recientes con dos de estas toxinas han demostrado que, además de ser hemorrágicas, son capaces de inducir necrosis de músculo esquelético. Ownby *et al.* (1978) observaron células musculares necróticas a nivel ultraestructural en ratones inoculados con la toxina hemorrágica *b* del veneno de la cascabel *Crotalus atrox*. Posteriormente, Fabiano y Tu (1981) demostraron que la viriditoxina, aislada del veneno de *Crotalus viridis viridis*, induce

hemorragia y mionecrosis en animales experimentales. Pese a que no se ha descrito efectos miotóxicos en la acción de otras toxinas hemorrágicas, es posible que lo anterior se deba a la carencia de estudios histológicos y no al hecho de que las toxinas hemorrágicas no induzcan mionecrosis.

La toxina hemorrágica *b* es una enzima proteolítica con un peso molecular de 27.000 daltons (Bjarnason y Tu, 1978). La viriditoxina es también una enzima proteolítica pero está compuesta por dos subunidades; su peso molecular es de 115.000 daltons (Fabiano y Tu, 1981). No se ha efectuado estudios tendientes a esclarecer el mecanismo de acción de estas toxinas en músculo esquelético; sin embargo, Gleason *et al.* (1983) observaron que la viriditoxina induce hemorragia muy rápidamente después de inoculada, en tanto que el efecto mionecrótico de esta toxina aparece después. Estos autores sugirieron que las lesiones musculares se originan a consecuencia de la isquemia local resultante de la acción hemorrágica. Es necesario efectuar más estudios morfológicos y bioquímicos para demostrar si efectivamente las toxinas hemorrágicas son capaces de inducir miotoxicidad como efecto secundario a la isquemia tisular.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Charlotte L. Ownby, con quien hemos tenido discusiones muy fructíferas sobre este tema y a los compañeros del Instituto Clodomiro Picado por su colaboración y por sus críticas constructivas.

#### RESUMEN

Desde los puntos de vista bioquímico y farmacológico, las miotoxinas aisladas de venenos de serpientes se ubican en cuatro grupos: (1) Fosfolipasas A miotóxicas, (2) miotoxinas básicas de bajo peso molecular, (3) cardiotoxinas de venenos elapídeos y (4) miotoxinas hemorrágicas. Las fosfolipasas miotóxicas notequina, taipoxina, crotoxina y miotoxina de *Bothrops asper* afectan inicialmente la integridad de la membrana plasmática, induciéndose un influjo de calcio que culmina con la muerte celular. Las miotoxinas básicas de bajo peso molecular crotamina y miotoxina *a* actúan específicamente en los canales de sodio del sarcolema, induciendo un influjo de sodio que

trae como consecuencia despolarización y contracción muscular y vacuolización del retículo sarcoplásmico. Las cardiotoxinas son polipéptidos básicos capaces de desorganizar la estructura de las membranas, siendo su acción miotóxica una consecuencia de la alteración drástica que las mismas inducen en el sarcolema del músculo esquelético. Finalmente, dos componentes hemorrágicos (toxina hemorrágica *b* y viriditoxina) poseen actividad miotóxica, habiéndose sugerido que este efecto es una consecuencia de la isquemia tisular resultante de la acción hemorrágica de estos componentes.

#### REFERENCIAS

- Bjarnason, J. B., & A. T. Tu. 1978. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin *e*. *Biochemistry*, 17: 3395-3404.
- Cameron, D., & A. T. Tu. 1977. Characterization of myotoxin *a* from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, 16: 2546-2553.
- Cameron, D. L., & A. T. Tu. 1978. Chemical and functional homology of myotoxin *a* from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. *Biochim. Biophys. Acta*, 532: 147-154.
- Cate, R. L., & A. L. Bieber. 1978. Purification and characterization of Mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*) toxin and its subunits. *Arch. Biochem. Biophys.*, 189: 397-408.
- Caterall, W. A. 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20: 15-43.
- Chang, C. C. 1979. The action of snake venoms on nerve and muscle, p. 309-376. *In* C. Y. Lee, (ed.). *Snake Venoms*. Springer-Verlag. Berlin.
- Chang, C. C., & K. H. Tseng. 1978. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 63: 551-559.
- Chang, C. C., S. J. Hong, & M. J. Su. 1983. A study on the membrane depolarization of skeletal muscles caused by a scorpion toxin, sea anemone toxin II and crotamine and the interaction between toxins. *Br. J. Pharmacol.*, 79: 673-680.
- Cheyamol, J., J. M. Gonçalves, F. Bourillet, & M. Roch-Arveiller. 1971. Action neuromusculaire

- comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. I. Sur préparations neuromusculaires *in situ*. *Toxicon*, 9: 279-286.
- Duchen, L. W., B. J. Excell, R. Patel, & B. Smith. 1975. Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration. A light and electron microscopic study of the effects of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. *J. Neurol. Sci.*, 21: 391-417.
- Dufourcq, J., J. F. Faucon, E. Bernard, & M. Pezolet. 1982. Structure-function relations for cardiotoxins interacting with phospholipids. *Toxicon*, 20: 165-174.
- Engel, A. G., & C. Biesecker. 1982. Complement activation in muscle fiber necrosis: Demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Ann. Neurol.*, 12: 289-296.
- Engle, C. M., R. R. Becker, T. Bailey, & A. L. Bicker. 1983. Characterization of two myotoxic proteins from venom of *Crotalus viridis concolor*. *Fed. Proc.*, 42: 2187.
- Fabiano, R., & A. T. Tu. 1981. Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom. *Biochemistry*, 20: 21-27.
- Farber, J. L. 1981. The role of calcium in cell death. *Life Sciences*, 29: 1289-1295.
- Farber, J. L. 1982. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab. Invest.*, 47: 114-123.
- Fohlman, J., D. Eaker, E. Karlsson, & S. Thesleff. 1976. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. *Eur. J. Biochem.*, 68: 457-469.
- Fox, J. W., M. Elzinga, & A. T. Tu. 1979. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin *a* isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, 18: 678-684.
- Ginn, F.L., J. D. Shelburne, & B. F. Trump. 1968. Disorders of cell volume regulation. 1. Effects of plasma membrane adenosine triphosphatase with ouabain. *Amer. J. Pathol.*, 53: 1044-1071.
- Gleason, M.L., G. V. Odell, & C. L. Ownby. 1983. Isolation and biological activity of viriditoxin and a viriditoxin variant from *Crotalus viridis viridis*. *Toxin Rev.*, 2: 235-265.
- Gopalakrishnakone, P., B. Hawgood, S. E. Holbrooke, N. A. Marsh, S. Santana de Sa, & A. T. Tu. 1980. Sites of action of Mojave toxin isolated from the venom of the Mojave rattlesnake. *Br. J. Pharmacol.* 69: 421-431.
- Gopalakrishnakone, P., D. W. Dempster, B. J. Hawgood, & H. Y. Elder. 1984. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon*, 22: 85-98.
- Gulik-Krzywicki, T., M. Balerna, J.P. Vincent, & M. Lazdunski. 1981. Freeze-fracture study of cardiotoxin action on axonal membrane and axonal membrane lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 643: 101-114.
- Gutiérrez, J. M., & F. Cháves. 1980. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon*, 18: 315-321.
- Gutiérrez, J. M., F. Cháves, R. Bolaños, L. Cerdas, E. Rojas, O. Arroyo, & E. Portilla. 1981. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon*, 19: 493-500.
- Gutiérrez, J. M., C. L. Ownby, & G. V. Odell. 1984a. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*, 22: 115-128.
- Gutiérrez, J. M., C. L. Ownby, & G. V. Odell. 1984b. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.* (en prensa).
- Habermann, E., & H. Breithaupt. 1978. The crotoxin complex—an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon*, 16: 19-30.
- Harris, J.B., & M. A. Johnson. 1978. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 5: 587-600.
- Harris, J. B., & C.A. MacDonell. 1981. Phospholipase A<sub>1</sub> activity of notcxin and its role in muscle damage. *Toxicon*, 19: 419-430.
- Harris, J. B., & C. A. Maltin. 1982. Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin taipoxin of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. *Br. J. Pharmacol.*, 76: 61-75.
- Harris, J. B., M. A. Johnson, & E. Karlsson. 1975. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2: 383-404.

- Harris, J. B., M. A. Johnson, & C. A. MacDonell. 1980. Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins, p. 569-578. In D. Eaker & T. Wadstrom (eds.), *Natural Toxins*. Pergamon Press. Oxford.
- Homma, M., & A. T. Tu. 1971. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. J. Exp. Pathol.*, 52: 538-542.
- Hong, S. J., & C. C. Chang. 1983. Potentiation by crotamine of the depolarizing effect of batrachotoxin, protoveratrine *a* and grayanotoxin I on the rat diaphragm. *Toxicon*, 21: 503-514.
- Ishiura, S. 1981. Calcium-dependent proteolysis in living cells. *Life Sciences*, 29: 1079-1087.
- Karlsson, E. 1979. Chemistry of protein toxins in snake venoms, p. 159-212. In C. Y. Lee (ed.), *Snake Venoms*. Springer-Verlag. Berlin.
- Karlsson, E., D. Eaker, & L. Ryden. 1972. Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*, 10: 405-413.
- Klibansky, C., Y. London, A. Frenkel, & A. de Vries. 1968. Enhancing action of synthetic and natural basic polypeptides on erythrocyte-ghost phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta*, 150: 15-23.
- Laure, C. J. 1975. Die primärstruktur des crotamins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356: 213-215.
- Mebs, D. 1978. Pharmacology of reptilian venoms. p. 487-560. In C. Gans (ed.), *Biology of the Reptilia*. Academic Press. London.
- Mebs, D., Ehrenfeld, & Y. Samejima. 1983. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: Relationship to serum creatine kinase. *Toxicon*, 21: 393-404.
- Mokri, B., & A. G. Engel. 1975. Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*, 25: 1111-1120.
- Ng, R.H., & B. D. Howard. 1980. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum as model targets for neurotoxic and myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 77: 1346-1350.
- Odell, G.V., K. L. Eneff, C.L. Ownby, M.L. Gleason, J.M. Gutiérrez, S.A. Hudiburg, & T.R. Colberg. 1983. Characterization of venom myotoxins of *Crotalus durissus durissus*, the Central American rattlesnake. *Fed. Proc.*, 42: 1811.
- Ohsaka, A. 1979. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms, p. 480-546. In C. Y. Lee (ed.), *Snake Venoms*. Springer-Verlag: Berlin.
- Ownby, C. L., D. Cameron, & A. T. Tu. 1976. Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. *Amer. J. Pathol.*, 85: 149-166.
- Ownby, C.L., J. Bjarnason, & A. T. Tu. 1978. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Amer. J. Pathol.*, 93: 201-218.
- Ownby, C. L., J. M. Gutiérrez, T. R. Colberg, & G. V. Odell. 1982. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin *a* from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*, 20: 877-885.
- Pestronk, A., I. M. Parhad, D.B. Drachman, & D. L. Price. 1982. Membrane myopathy: Morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, 5: 209-214.
- Pluskal, M.G., J. B. Harris, R. J. Pennington, & D. Eaker. 1978. Some biochemical responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin (notexin) isolated from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 5: 131-141.
- Publicover, S.J., C. J. Duncan, & J. L. Smith. 1977. Ultrastructural changes in muscle mitochondria "in situ", including the apparent development of internal septa, associated with the uptake and release of calcium. *Cell Tissue Res.*, 185: 373-385.
- Russell, F. E., P. R. Pattabhiraman, R. C. Schaeffer, N. Tamiya, & N. Maeda. 1978. Some properties of the venom of *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon*, 16: 425.
- Schanne, F.A.X., A. B. Kane, E.E. Young, & J. L. Farber. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 206: 700-702.
- Trump, B. F., I. Berezsky, & A. Osornio-Vargas. 1981. Cell death and the disease process, p. 209-242. In I.D. Bowen & R. A. Loxkshin (eds.), *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman and Hall. London.
- Tu, A.T. 1982. Chemistry of rattlesnake venoms, p. 247-312. In A. T. Tu (ed.), *Rattlesnake Venoms, Their Actions and Treatment*. Marcel Dekker: New York.
- Vital-Brazil, O., J. Prado-Franceschi, & C. J. Laure. 1979. Repetitive muscle responses induced by crotamine. *Toxicon*, 17: 61-67.
- Wrogemann, K., & S. D. J. Pena. 1976. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet*, 1: 672-673.