

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**REGENERACIÓN MUSCULAR EN UN MODELO MURINO DE  
GANGRENA GASEOSA INDUCIDA CON UN INÓCULO SUBLETAL  
DE *Clostridium perfringens***

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Bacteriología

**ANA MARIEL ZÚÑIGA PEREIRA**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**2018**

## DEDICATORIA

A quienes siempre han estado ahí,  
a mi mamá y a mis abuelos

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi tutora, la Dra. Marietta Flores Díaz, por ser ejemplo de esfuerzo y pasión por la ciencia, por confiar en mí, brindarme su asesoramiento y motivarme cuando lo necesité.

Al Dr. Alberto Alape Girón, por abrirme las puertas del Instituto Clodomiro Picado, por su apoyo incondicional y por mejorar el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Alexandra Rucavado Romero, por estar siempre anuente a compartir sus conocimientos y brindarme su ayuda.

Agradezco además al Dr. Carlos Santamaría Quesada por abrirme las puertas de su laboratorio en el Hospital Nacional de Niños, por su paciencia y su asesoría.

Al Dr. José María Gutiérrez, quien siempre estuvo atento al desarrollo de este trabajo, gracias por sus ideas y mejoras. A la Dra. Teresa Escalante, por ayudarme cuando lo necesité.

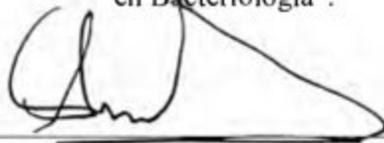
A todo el personal del Instituto Clodomiro Picado, quienes siempre están atentos a brindar ayuda y que hacen del ICP un lugar ameno, un lugar feliz.

A mis compañeros de la maestría y de la vida, Ana Silvia, Wendy, Gabriel, Lisa y Kattia, esto no hubiese sido lo mismo sin ustedes.

A mi madre, mi ejemplo de vida. A mi familia, mi pilar, por su amor incondicional, por apoyar mis proyectos y anhelos.

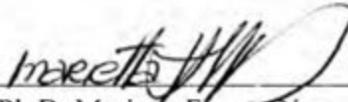
Para el desarrollo de esta investigación se contó con el financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica mediante los proyectos N°741-B8-135 y N°741-B5-103, y con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones. Se les agradece a ambas entidades su aporte.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Bacteriología”.



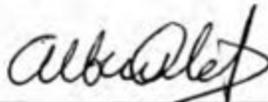
---

Ph.D. Enrique Freer Bustamante  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**



---

Ph.D. Marietta Flores Díaz  
**Directora de Tesis**



---

Ph.D. Alberto Alape Girón  
**Asesor**



---

Ph.D. Alexandra Rucavado Romero  
**Asesora**



---

Ph.D. César Rodríguez Sánchez  
**Director**

**Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica**



---

Ana Mariel Zúñiga Pereira  
**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xiii
<b>Capítulo 1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Clostridium perfringens</i> .....	1
1.1.2. Fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> .....	2
1.1.3. Perfringolisina O.....	4
1.1.4. Gangrena gaseosa generada por <i>C. perfringens</i> .....	5
1.2. Regeneración muscular.....	7
1.2.1. Fase regenerativa.....	9
1.2.2. Fase de remodelación y reparación.....	12
1.2.3. Papel del sistema inmune durante el proceso de regeneración muscular ...	13
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
<b>Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1. Animales de experimentación.....	24
2.2. Modelo murino de gangrena gaseosa.....	24
2.3. Caracterización del daño muscular agudo después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	25
2.3.1 Determinación de CK en plasma.....	25
2.3.2 Análisis histológico del daño muscular agudo mediante microscopía de luz .....	25

2.3.3. Determinación de la persistencia de <i>C. perfringens</i> en el músculo .....	25
2.4. Caracterización de la respuesta inflamatoria aguda después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	26
2.4.1. Determinación de la expresión de moléculas inflamatorias mediante PCR-RT .....	26
2.4.2. Determinación de la expresión de moléculas inflamatorias mediante ELISAs de captura.....	29
2.4.3. Detección de distintas células inflamatorias mediante inmunohistoquímica de fluorescencia .....	29
2.5. Caracterización del proceso de regeneración muscular después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	31
2.5.1. Análisis histológico de la regeneración muscular mediante microscopía de luz .....	31
2.5.2. Análisis de la densidad de vasos capilares y nervios mediante inmunohistoquímica de fluorescencia .....	32
2.6. Análisis estadístico .....	33
<b>Capítulo 3. RESULTADOS</b> .....	35
3.1. Caracterización del daño muscular agudo después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	35
3.1.1. Daño muscular inducido por un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	35
3.1.2. Persistencia de <i>C. perfringens</i> en el músculo infectado con un inóculo subletal de la bacteria .....	37
3.2. Caracterización de la respuesta inflamatoria aguda después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	38
3.2.1. Expresión de genes de moléculas asociadas con la respuesta inflamatoria después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	38
3.2.2. Detección de células inflamatorias después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	41
3.3. Caracterización del proceso de regeneración muscular después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	45
3.3.1. Descripción histológica del proceso de regeneración muscular después de un reto con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	45
3.3.2. Alteraciones en la densidad muscular de vasos capilares y nervios después de un reto con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	49

<b>Capítulo 4. DISCUSIÓN</b> .....	54
4.1. Daño muscular inducido por un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	54
4.2. Respuesta inflamatoria aguda después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	55
4.3. Proceso de regeneración muscular después de un reto con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	59
CONCLUSIONES .....	63
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	66
REFERENCIAS .....	67

## RESUMEN

*Clostridium perfringens*, uno de los patógenos de humanos y animales más ampliamente distribuido en la naturaleza, es el agente causal más frecuente de la gangrena gaseosa en humanos. En la patogénesis de esta enfermedad, la fosfolipasa C y la perfringolisina O producidas por *C. perfringens*, actúan de manera sinérgica induciendo una severa mionecrosis. La regeneración del tejido muscular posterior a la mionecrosis ocurre en cuatro fases interrelacionadas: degeneración, inflamación, regeneración y remodelación; de ellas, la inflamación es claramente un componente crítico del proceso regenerativo. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta inflamatoria durante el daño y la regeneración muscular, en un modelo murino de gangrena gaseosa inducida con un inóculo subletal de  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens*. Se determinó que el uso de dicho inóculo induce una lesión que es controlada antes de 24 horas. La infección genera daño vascular significativo durante las primeras 6 horas, lo que limita la migración de células inflamatorias. Un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ , desde las 6 horas hasta las 48 horas postinfección, se asocia a la presencia de infiltrado inflamatorio; sin embargo, la ausencia de la expresión de IFN $\gamma$ , un bajo número de macrófagos M1 en su pico máximo ( $142.60 \pm 18.21$  células por  $\text{mm}^2$ ) en comparación con el de PMNs ( $548.40 \pm 56.40$  células por  $\text{mm}^2$ ) y macrófagos M2 ( $616.20 \pm 179.40$  células por  $\text{mm}^2$ ), una deficiente actividad fagocítica y la prolongación de la permanencia de células proinflamatorias hasta por 5 días, implican alteraciones en la respuesta inmune y la regeneración muscular. Aunque la infección induce extravasación de infiltrado inflamatorio, la bacteria permanece viable en el tejido hasta por al menos 9 días, lo cual tiene implicaciones clínicas importantes. Un aumento en la expresión del TGF $\beta$ 1 a los 6 días después del daño muscular y la consecuente acumulación de colágeno en un  $23.5 \pm 5.6\%$  del tejido total a los 30 días, provoca que el proceso de regeneración muscular sea deficiente después de una infección con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Estos resultados proveen nueva información sobre la patogénesis la gangrena gaseosa causada por *C. perfringens* y abren perspectivas para el desarrollo de nuevas terapias en esta enfermedad.

## ABSTRACT

*Clostridium perfringens*, one of the most widely distributed human and animal pathogens in nature, is the most frequent causative agent of gas gangrene in humans. In the pathogenesis of this disease, phospholipase C and perfringolysin O produced by *C. perfringens* act synergistically inducing severe myonecrosis. The regeneration of muscle tissue after myonecrosis occurs in four interrelated phases: degeneration, inflammation, regeneration and remodeling, among them, inflammation is clearly a critical component of the regenerative process. The objective of this work was to characterize the inflammatory response during muscle damage and regeneration in a murine model of gas gangrene induced with a sublethal inoculum of  $1 \times 10^6$  CFU of *C. perfringens*. It was determined that a sublethal inoculum induces a lesion that is controlled before 24 hours. The infection causes severe damage during the first 6 hours, which limits the migration of inflammatory cells. A significant increase in the proinflammatory cytokines IL1 $\beta$ , IL6 and TNF $\alpha$ , from 6 hours to 48 hours post-infection is associated with the presence of an inflammatory infiltrate; however, the absence of IFN $\gamma$  expression, a low number of M1 macrophages at their maximum number ( $142.60 \pm 18.21$  cells per  $\text{mm}^2$ ) compared with that of PMNs ( $548.40 \pm 56.40$  cells per  $\text{mm}^2$ ) and M2 macrophages ( $616.20 \pm 179.40$  cells per  $\text{mm}^2$ ), a deficient phagocytic activity and the prolongation of the permanence of proinflammatory cells for up to 5 days, imply alterations in the immune response and in the muscle regeneration process. Although the infection causes extravasation of inflammatory infiltrate, the bacterium remains viable in the tissue for at least 9 days, which has important clinical implications. An increase in the expression of TGF $\beta$ 1 6 days after muscle damage and the consequent accumulation of collagen in a  $23.5 \pm 5.6\%$  of the total tissue at 30 days, causes the process of muscle regeneration be deficient after an infection with a sublethal inoculum of *C. perfringens*. These results show new information on the pathogenesis of gas gangrene caused by *C. perfringens* and open perspectives for the development of new therapies in this disease.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Oligonucleótidos utilizados en el análisis de la respuesta inflamatoria inducida con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> mediante PCR-RT .....	28
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Representación esquemática de las fases de la regeneración muscular.....	8
<b>Fig. 2.</b> Representación esquemática del ciclo de activación, proliferación y diferenciación de las células satélite después de una lesión muscular.....	10
<b>Fig. 3.</b> Tiempo relativo de invasión de las distintas células inflamatorias después de una lesión muscular.....	14
<b>Fig. 4.</b> Diagrama de los macrófagos activados al fenotipo M1 por citoquinas Th1 (parte superior) o al fenotipo M2 por citoquinas Th2 (parte inferior).....	16
<b>Fig. 5.</b> Mionecrosis causada por la infección con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> ....	36
<b>Fig. 6.</b> Persistencia de bacterias en el tejido luego de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	37
<b>Fig. 7.</b> Expresión de citoquinas en gastrocnemius de animales después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	39
<b>Fig. 8.</b> Expresión de quimioatrayentes en gastrocnemius de animales después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	40
<b>Fig. 9.</b> Reclutamiento de PMNs al sitio de la lesión después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	42
<b>Fig. 10.</b> Presencia de macrófagos de los fenotipos M1 y M2 en el sitio de la lesión después una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	44
<b>Fig. 12.</b> Eficiencia de la regeneración muscular y tamaño de las fibras regenerativas después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	46
<b>Fig. 13.</b> Tinción de colágeno en gastrocnemius después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	48
<b>Fig. 14.</b> Expresión de TGF $\beta$ en homogenizados de gastrocnemius de animales después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> .....	49

<b>Fig. 15.</b> Número de vasos capilares en gastrocnemius después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> . .....	51
<b>Fig. 16.</b> Inervación en gastrocnemius después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> . .....	53
<b>Fig. 17.</b> Comparación del tiempo de llegada de células inflamatorias después de una infección experimental con un inóculo subletal de <i>C. perfringens</i> con los tiempos de llegada de células inflamatorias reportados en la literatura. ....	58

## LISTA DE ABREVIACIONES

BHI: Infusión cerebro corazón  
CK: Creatina quinasa  
CpPLC: Fosfolipasa C de *C. perfringens*  
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
HE: Hematoxilina/eosina  
ICAM: Molécula de adhesión intercelular 1  
IFN $\gamma$ : Interferón gamma  
IL: Interleucina  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
MCP1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1  
MIP2: Proteína inflamatoria de macrófagos 2  
MRF: Factores reguladores miogénicos  
NO: Óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintasa  
PBS: Buffer fosfato salino  
PCR-RT: Reacción en cadena de la polimerasa-Tiempo real  
PFO: Perfringolisina O  
PMNs: Polimorfonucleares  
RNSP1: Proteína S1 de unión al ácido ribonucleico  
RPL13A: Proteína ribosomal L13A  
SCs: Células satélite  
SE: Error estándar  
TGF $\alpha/\beta$ : Factor de crecimiento transformante alfa/beta  
TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
UFC: Unidades formadoras de colonias

## ANTECEDENTES

### 1.1. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* es un bacilo Gram-positivo, formador de esporas, anaerobio, distribuido de manera ubicua en la naturaleza, presente en suelos, alimentos, aguas residuales, así como en el tracto gastrointestinal y heces de humanos y muchos animales (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003; Li *et al.*, 2013; Bryant y Stevens, 2015). Esta bacteria es uno de los patógenos más comunes e importantes para el ser humano y el ganado, implicada en un espectro de enfermedades que incluye: la enteritis necrótica, enterotoxemia, celulitis anaeróbica y las infecciones histotóxicas como la gangrena gaseosa (mionecrosis por clostridios) (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003; Li *et al.*, 2013; Uzal *et al.*, 2014).

El genoma completo de *C. perfringens* fue analizado en el 2002 por Shimizu *et al.*, quienes reportaron que dicho genoma está constituido por 3 031 430 pb, con 2660 regiones codificantes para proteínas. Dentro de estas últimas, la bacteria sintetiza enzimas sacarolíticas, así como aquellas típicas de fermentación que conducen a la producción de gas; sin embargo, carece de enzimas para la biosíntesis de aminoácidos, por lo que mediante la producción de toxinas y enzimas degradativas, obtiene los nutrientes esenciales a partir de su hospedero (Shimizu *et al.*, 2002; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003).

*C. perfringens* se distingue de otras bacterias pertenecientes a su género al tener un gran número de genes para factores de virulencia (Shimizu *et al.*, 2002), y aunque la virulencia de esta bacteria depende de su habilidad prolífica de producir toxinas y enzimas extracelulares, una única cepa no produce todas las toxinas conocidas para la especie (Li *et al.*, 2013). Por lo anterior, se ha establecido un sistema de clasificación que asigna los aislamientos de *C. perfringens* a tipos de la A a la E, con base en su habilidad de producir cuatro toxinas: alfa, beta, épsilon e iota (Li *et al.*, 2013).

De las cinco cepas, las tipo A son las que se encuentran asociadas con la gangrena gaseosa en humanos y producen las cantidades más elevadas de la  $\alpha$ -toxina o fosfolipasa C de *C.*

*perfringens* (Cp-PLC) (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003). La  $\alpha$ -toxina junto con la  $\theta$ -toxina (perfringolisina O o PFO), son las principales toxinas extracelulares de *C. perfringens* implicadas en la gangrena gaseosa (Bryant y Stevens, 2010; Stevens *et al.*, 2012).

### 1.1.2. Fosfolipasa C de *C. perfringens*

La fosfolipasa C de *C. perfringens*, considerada el factor de virulencia más importante en la patogénesis de la gangrena gaseosa, se encuentra codificada a nivel cromosómico en todos los toxinotipos de *C. perfringens*, y muestra sólo variaciones mínimas de secuencia entre las distintas cepas de la bacteria (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003; O'Brien *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). Consiste en una metalofosfolipasa dependiente de zinc con actividad fosfolipasa C y esfingomielinasa; corta grupos fosfatidilcolina de la superficie externa de la bicapa lipídica de las células del hospedero, lo que genera perturbación de la función de las membranas celulares, conduciendo a la lisis y necrosis celular (Li *et al.*, 2013).

Según su análisis estructural, la CpPLC posee dos dominios unidos por una región de enlace flexible: el dominio N-terminal, constituido por nueve  $\alpha$ -hélices que incluye el sitio activo de la enzima, y el dominio C-terminal que consiste de ocho motivos  $\beta$ -sandwich y que es responsable de la unión a membrana dependiente de calcio (Naylor *et al.*, 1998; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003; Bryant y Stevens, 2015). Se ha sugerido que la unión del dominio C-terminal a la membrana blanco induce un cambio conformacional en el dominio N-terminal, lo que le permite al sitio activo hidrolizar el agregado de fosfolípidos (Eaton *et al.*, 2002; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003). Aunque ambos dominios se requieren para la toxicidad celular y son inmunogénicos, sólo el dominio C-terminal estimula una respuesta protectora (Li *et al.*, 2013; Bryant y Stevens, 2015).

Respecto a su actividad biológica, *in vivo* la CpPLC disminuye la contractibilidad cardíaca, aumenta la permeabilidad capilar, induce la agregación de plaquetas, hemólisis, mionecrosis y es letal. En altas concentraciones de esta toxina, se da una degradación masiva de fosfolípidos, la disrupción de la membrana y citólisis (Tidball *et al.*, 1999; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003).

La CpPLC posee efecto sobre células endoteliales, plaquetas y leucocitos, conduciendo a la carencia de infiltrado inflamatorio en los tejidos infectados por *C. perfringens* (Stevens, 2000). Puede estimular la producción de interleucina-8 (IL8) derivada de células endoteliales; a concentraciones fisiológicas, la IL8 en la gangrena gaseosa puede amplificar el reclutamiento de leucocitos y prepararlos para aumentar la actividad del estallido respiratorio (Smith *et al.*, 1993; Kitayama *et al.*, 1997). Sin embargo, en altas concentraciones esta citoquina atenúa la trans migración de leucocitos a través de la monocapa de células endoteliales, debido a la inhibición de la polimerización de la F-actina de los polimorfonucleares (PMNs) (Smith *et al.*, 1993; Kitayama *et al.*, 1997).

Adicionalmente, esta toxina sobrerregula la producción de moléculas de adhesión en células endoteliales y leucocitos, incluyendo la molécula de adhesión leucocitaria al endotelio, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la P-selectina en la superficie de células endoteliales cultivadas, alterando el proceso de adherencia de leucocitos y su extravasación (Stevens, 2000; Bryant y Stevens, 1996; Bunting *et al.*, 1997; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003). La CpPLC induce la formación de agregados entre plaquetas y PMNs que causan la oclusión vascular, mejora las condiciones para el crecimiento anaerobio y promueve una rápida difusión de la infección en los tejidos del hospedero (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003).

Si bien el efecto mionecrótico de la CpPLC depende de la capacidad de hidrolizar fosfolípidos de membrana, la disrupción de las membranas del hospedero no es el único mecanismo mediante el cual esta toxina genera daño celular (Li *et al.*, 2013). Producto de una hidrólisis limitada de fosfatidilcolina y esfingomiélinea, a bajas concentraciones, la CpPLC conduce a la producción de los segundos mensajeros diacilglicerol y ceramida, importantes en rutas de señalización del hospedero (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003). Se ha demostrado que la CpPLC activa la vía MEK/ERK, que induce estrés oxidativo en las células afectadas (Monturiol-Gross *et al.*, 2012) y que está implicada en la producción de IL8 por la estimulación de las vías ERK1/2 y de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (Oda *et al.*, 2012).

El contenido de gangliósidos en la membrana plasmática puede afectar la extensión de la degradación de fosfolípidos, de modo que a menor cantidad de gangliósidos, aumenta la capacidad de la CpPLC para unirse y adquirir su conformación activa (Flores-Díaz *et al.*, 1998). En células musculares, caracterizadas por un bajo contenido de gangliósidos (Flores-Díaz, 2001), el daño generado por la CpPLC a las membranas, es evidenciado por un rápido aumento en los niveles plasmáticos de la actividad creatina quinasa (CK) después de la inyección intramuscular (Alape-Girón *et al.*, 2000).

Varias líneas de evidencia indican que la CpPLC es el principal factor de virulencia en la gangrena gaseosa: primero, la inyección intramuscular de la CpPLC recombinante causa mionecrosis y reproduce características histopatológicas de la gangrena gaseosa en ratones (Bunting *et al.*, 1997); segundo, la inmunización con el fragmento C-terminal de la CpPLC protege ratones del reto con  $10^9$  células vegetativas viables de *C. perfringens* inyectadas intramuscularmente (Williamson y Titball, 1993); tercero, una cepa mutante de *C. perfringens* para el gen *plc*, es incapaz de producir gangrena gaseosa y recuperan la virulencia cuando se complementan con un plásmido que contiene el gen *plc* silvestre (Awad *et al.*, 1995).

### 1.1.3. Perfringolisina O

La perfringolisina O (PFO) es un miembro de las citolisinas dependientes de colesterol que incluye la estreptolisina O de los estreptococos del grupo A, la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y muchas más (Stevens *et al.*, 2012). Una vez en contacto con el colesterol de la membrana celular, los monómeros de la toxina oligomerizan, se insertan en la membrana y forman un poro que produce lisis celular (Shepard *et al.*, 1998). Además, en cantidades sublíticas, la PFO contribuye a la patogénesis de la gangrena gaseosa mediante la modulación de la respuesta inflamatoria a la infección (Bryant *et al.*, 1993; Stevens *et al.*, 1997).

En contraste a la CpPLC, la PFO causa un aumento modesto en el ICAM-1 endotelial, no tiene efecto en la expresión de E-selectina y no induce una síntesis detectable de IL8

(Bryant y Stevens, 1996; Stevens y Bryant, 2002). En ratones, la inyección intramuscular de PFO produce una marcada leucostasis vascular adyacente al sitio de la inyección de la toxina (Bryant *et al.*, 1993; Stevens y Bryant, 2002), por lo que en la modulación de la respuesta inflamatoria, la PFO afecta más a los PMNs que a la función de las células endoteliales. De hecho, concentraciones subléxicas de PFO dependientes de la dosis, estimulan una migración azarosa de PMNs y disminuye la migración directa hacia el quimioatrayente de origen bacteriano N-formil-metionil-leucil-fenilalanina o a quimioatrayentes derivados del complemento, debido a que previene la polimerización de la F-actina en los PMNs (Stevens *et al.*, 1987; Stevens y Bryant, 2002).

Estudios en los que se utilizó una cepa 13 mutante nula para la PFO y sus derivados complementados, demostraron que la PFO no es esencial para el desarrollo de la enfermedad causada por *C. perfringens*, pero sí afecta la respuesta inflamatoria del hospedero por medio de la contribución a la carencia de infiltrado inflamatorio al sitio de la lesión, y a la acumulación vascular de los PMNs alrededor del sitio de la infección (O'Brien *et al.*, 2004). Más aún, la PFO parece ser la principal toxina responsable de la muerte de macrófagos peritoneales *in vitro* y junto con la CpPLC, permite a *C. perfringens* escapar del fagosoma de macrófagos (O'Brien *et al.*, 2004).

#### **1.1.4. Gangrena gaseosa generada por *C. perfringens***

La gangrena gaseosa es la enfermedad necrotizante más fulminante que afecta a los humanos (Bryant *et al.*, 2000). La infección se puede establecer completamente en 6 a 8 horas, y la destrucción del músculo sano adyacente puede progresar varios centímetros por hora a pesar del uso de antibióticos (Bryant *et al.*, 2000). Se caracteriza por fiebre, aparición repentina de dolor prominente, edema local masivo, mionecrosis severa y la acumulación de gas en el sitio de la infección (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003).

La enfermedad causada por *C. perfringens* requiere la penetración de formas vegetativas o esporas en una herida o trauma (Stevens *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). El daño

por laceración de arterias grandes o medianas, fracturas abiertas de huesos largos contaminadas con suelo, la lesiones en el abdomen penetrantes (por ejemplo, cuchillo, bala) o cirugía de intestino/vías biliares donde el contenido del intestino se filtra en los tejidos blandos, predisponen a la gangrena gaseosa por *C. perfringens*; también puede estar asociada con el aborto, placenta retenida o muerte fetal intrauterina, entre otras (Bryant y Stevens, 2010). En ocasiones, la gangrena gaseosa se puede asociar con diabetes mellitus, enfermedad vascular periférica o una malignidad subyacente gastrointestinal o hematológica (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003).

Independientemente de la causa, la herida genera la interrupción del flujo sanguíneo a los tejidos y como consecuencia una isquemia localizada en los mismos (Li *et al.*, 2013). De esta manera, se dan las condiciones requeridas para la germinación de las esporas de *C. perfringens*, el subsecuente crecimiento de las células vegetativas y la producción extracelular de las toxinas (Li *et al.*, 2013).

En el transcurso de la infección, la mionecrosis es acompañada por fascitis necrotizante y necrosis cutánea; pese al uso de antibióticos, en muchos casos de gangrena gaseosa inducida por *C. perfringens*, la única opción para tratarla es la amputación radical (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003). De no ser tratada, la gangrena gaseosa es fatal debido a la interrupción de las funciones cardíacas y el fallo multiorgánico, producto de la liberación de las toxinas al torrente sanguíneo (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003; O'Brien *et al.*, 2007).

A nivel histopatológico, esta enfermedad se caracteriza por la ausencia de PMNs infiltrados en el tejido necrótico y su acumulación entre los planos faciales y dentro de pequeños vasos sanguíneos en los bordes del área necrosada (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003; Stevens *et al.*, 2012; Bryant y Stevens, 2010). La rápida progresión de la infección y la extensión de la necrosis se asocia a la perfusión deficiente del tejido que resulta de la disfunción vascular, la ausencia de una respuesta inflamatoria tisular aguda, así como a la producción de potentes citotoxinas y proteasas por la bacteria (Stevens *et al.*, 2012).

## 1.2. Regeneración muscular

El músculo esquelético comprende entre el 40 y 50% de la masa del cuerpo humano (Turner y Badylak, 2012). Las fibras musculares, rodeadas por tejido conectivo y agrupadas en haces musculares, son las unidades contráctiles básicas del músculo esquelético, el cual se encuentra altamente vascularizado para proveer nutrientes esenciales para la función muscular (Chargé y Rudnicki, 2004). Conforme la miofibra madura, entra en contacto con una sola neurona motora y expresa moléculas características para la función contráctil; el músculo esquelético adulto está compuesto de una mezcla de miofibras con distintas propiedades fisiológicas y la proporción de cada tipo de fibra dentro de un músculo determina su propiedad contráctil total (Chargé y Rudnicki, 2004). A pesar de tener distintas propiedades fisiológicas, el mecanismo básico de la contracción muscular es similar en todos los tipos de miofibras y es el resultado de un mecanismo corredizo de los filamentos gruesos de miosina sobre los filamentos delgados de actina, después de la activación neuronal (Chargé y Rudnicki, 2004). De esta manera, las propiedades funcionales del músculo esquelético dependen del mantenimiento de una compleja estructura de miofibras, neuronas motoras, vasos sanguíneos y la matriz del tejido conectivo extracelular (Chargé y Rudnicki, 2004).

En heridas musculares que resultan en un trauma del músculo sin una pérdida significativa del tejido, el músculo puede activar una respuesta compleja que conduce a la reparación exitosa y regeneración del tejido dañado (Turner y Badylak, 2012; Tidball, 2011). La regeneración y reparación muscular ocurre en cuatro fases interrelacionadas: degeneración, inflamación, regeneración y remodelación (**Figura 1**) (Carosio *et al.*, 2011).

Inicialmente en la degeneración, la lesión permite la entrada de calcio extracelular que induce la activación de proteasas dependientes de calcio, conduciendo a la rápida desintegración de las miofibras que conduce a una rápida necrosis (Carosio *et al.*, 2011; Turner y Badylak, 2012). Este evento se caracteriza por la disrupción del sarcolema de la miofibra y resulta en el incremento de la permeabilidad de las mismas; como consecuencia,

los niveles séricos de proteínas musculares normalmente restringidas al citosol de la miofibra, como la CK, incrementan (Karalaki *et al.*, 2009). La presencia de fibras necróticas activa la respuesta inflamatoria en la que el músculo es invadido por poblaciones de células inflamatorias específicas de manera secuencial (Carosio *et al.*, 2011). Paralela a la respuesta inflamatoria, la fase regenerativa se caracteriza por la activación de células madre o células satélite (SCs) y por la presencia de fibras regenerativas, identificadas por un núcleo central (Carosio *et al.*, 2011). La fase final es un periodo durante el cual ocurre la maduración de las miofibras regeneradas (remodelación de la matriz extracelular) y la recuperación del rendimiento funcional del músculo dañado (Carosio *et al.*, 2011).



**Fig. 1. Representación esquemática de las fases de la regeneración muscular.**

Adaptado de Carosio *et al.*, 2011.

A pesar de la capacidad regenerativa del músculo, su habilidad para repararse a sí mismo después de un daño depende del tipo y severidad de la herida, siendo difícil un proceso de reparación eficiente en su totalidad (Turner y Badylak, 2012). Si la magnitud o frecuencia del daño muscular es muy grande, como cuando se asocia con un daño traumático, el músculo

dañado no será capaz de montar un programa exitoso de reparación y regeneración, y si más de un 20% del músculo se pierde, el proceso natural de reparación fallará en reparar el defecto y resultará en una acumulación de tejido fibroso, denervación del músculo distal al defecto y la pérdida de función (Tidball, 2011; Turner y Badylak, 2012).

### 1.2.1. Fase regenerativa

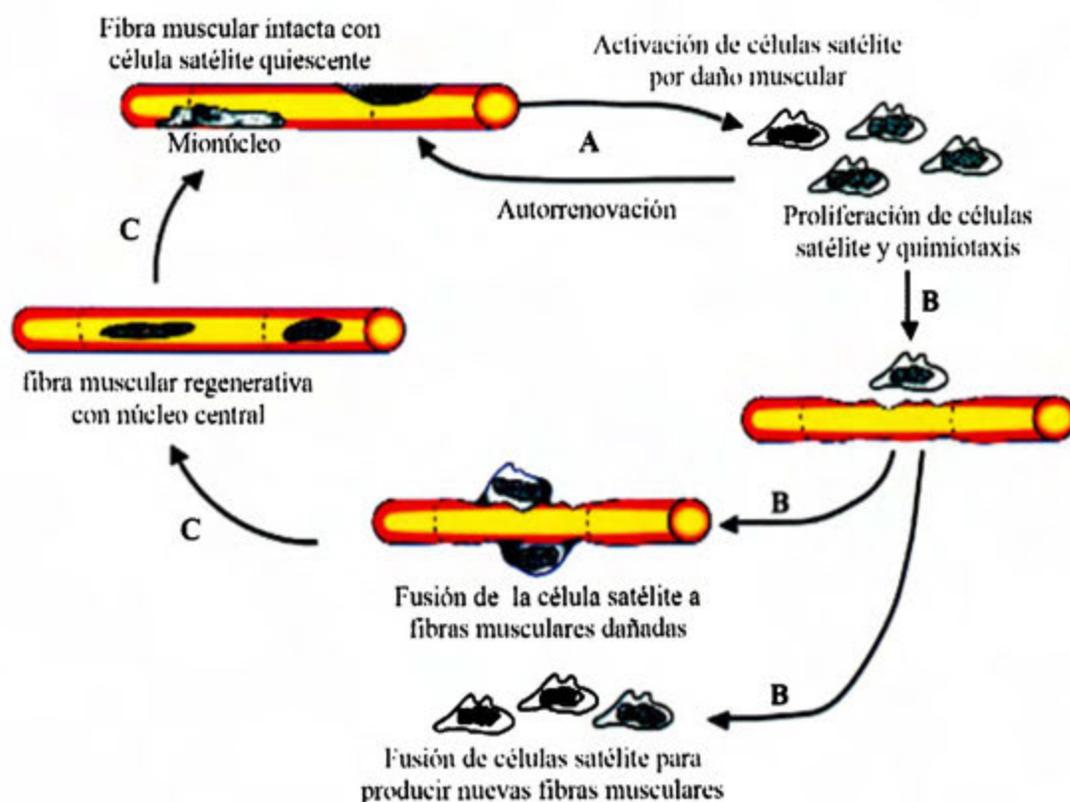
La fase regenerativa se caracteriza por la fagocitosis de las fibras musculares necróticas y la generación de nuevas fibras musculares (Turner y Badylak, 2012). Un grupo de células de reserva indiferenciadas son activadas, entonces entran al ciclo celular, proliferan y finalmente las células miogénicas se diferencian y se fusionan a fibras existentes dañadas para repararse una a la otra y llevar a cabo la formación de la nueva miofibrila (Carosio *et al.*, 2011; Karalaki *et al.*, 2009).

La liberación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento tumoral (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ ) y los factores de crecimiento derivados de plaquetas, en el sitio de la lesión, regulan la proliferación y diferenciación de mioblastos para promover la regeneración y reparación del músculo (Carosio *et al.*, 2011).

Aunque múltiples tipos de células madre con potencial de diferenciación en el linaje muscular han sido identificadas, el papel dominante en la homeostasis del músculo y la regeneración lo juegan las SCs (**Figura 2**) (Carosio *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2015). Durante el desarrollo embrionario, las SCs emergen junto con el músculo en el cual residen y comparten el mismo origen; se localizan estrechamente yuxtapuestas entre el sarcolema de las fibras musculares y la lámina basal que rodea la fibra (Fu *et al.*, 2015). Las SCs de los músculos del tronco y de las extremidades se originan del dermomiótoma, mientras que la mayoría de las SCs de los músculos craneo-faciales se derivan del mesodermo de la cabeza (Fu *et al.*, 2015). El número de SCs alcanza su pico en la etapa neonatal, donde abarcan un 30-35% de los

núcleos totales de las miofibras, posteriormente el número disminuye al 2-7% del total del núcleos de la miofibra en la edad adulta (Fu *et al.*, 2015).

Las SCs son activadas en respuesta a estímulos fisiológicos, como ejercicio, y bajo condiciones patológicas, como una herida y enfermedades degenerativas, para generar una población de mioblastos capaces de fusionarse y diferenciarse (Carosio *et al.*, 2011). Son capaces de fusionarse con miofibras existentes, reparar fibras musculares dañadas o alternativamente, fusionarse entre sí para formar nuevas miofibras (Carosio *et al.*, 2011).



**Fig. 2. Representación esquemática del ciclo de activación, proliferación y diferenciación de las células satélite después de una lesión muscular.** La fase "A" corresponde a la etapa de activación y proliferación de las SCs, donde algunas de las células salen del ciclo celular y regresan a su estado quiescente para mantener la población de SCs. La etapa temprana de diferenciación celular en la regeneración se indica en "B", las células miogénicas mononucleadas se pueden fusionar con fibras existentes para su restauración, o

con otras células miogénicas para formar nuevas fibras. Los eventos en “C” corresponden a la etapa tardía de la diferenciación, en la que los núcleos centrales característicos de las células regenerativas, migran a la periferia de la fibra muscular. Adaptado de Tidball, 2011.

La morfología de las SCs activadas es diferente de aquellas de las SCs quiescentes. Estas últimas usualmente poseen poco citoplasma y pocas organelas, mientras que las SCs activadas son más grandes, con citoplasma expandido y más organelas (Fu *et al.*, 2015). Adicionalmente, las SCs muestran perfiles de expresión de genes específicos según se encuentren en un estado quiescente o en una etapa proliferativa; *Pax7*, *Pax3*, *M-cadherina*, *syndecan-4*, *CD34*,  $\alpha$ 7-*Integrina*, y *CXCR4* se expresan predominantemente en SCs quiescentes, mientras que la expresión de *MyoD* está ausente (Fu *et al.*, 2015). El marcador más temprano de las SCs activas es el p38 fosforilado, seguido por *MyoD*; aunque se detecta en la mayoría de SCs quiescentes, *Myf5* es altamente sobreexpresado en la activación (Fu *et al.*, 2015).

*Pax3* y *Pax7* pueden controlar la expresión de *Myf5* y *MyoD*, activadores transcripcionales hélice-bucle-hélice básicos, de la familia de factores reguladores miogénicos (MRFs) (Fu *et al.*, 2015; Carosio *et al.*, 2011). La especificación al linaje miogénico requiere la sobreexpresión de *MyoD* y *Myf5*, las células miogénicas proliferativas *MyoD* y/o *Myf5* positivas se denominan mioblastos (Chargé y Rudnicki, 2004). Los mioblastos proliferativos abandonan el ciclo celular para convertirse en miocitos diferenciados que expresan los MRFs tardíos, *Miogenina* y *MRF4*, y subsecuentemente genes específicos de músculo como miosina de cadena pesada y CK muscular (Chargé y Rudnicki, 2004). Finalmente, los miocitos mononucleados se fusionan con otros y eventualmente madurarán en fibras musculares contráctiles (Chargé y Rudnicki, 2004).

Además de los marcadores moleculares, las fibras regenerativas se pueden identificar por unirse a colorantes básicos, lo cual refleja la alta síntesis proteica; además, dichas fibras están divididas, probablemente debido a la fusión incompleta de las fibras regeneradas dentro de la misma lámina basal (Karalaki *et al.*, 2009). Cuando la fusión de las células miogénicas es completa, el tamaño de las miofibras recién formadas aumenta y el mionúcleo se mueve a la periferia de la fibra (Karalaki *et al.*, 2009).

Durante el curso del desarrollo muscular, una subpoblación de los mioblastos falla en diferenciarse, pero permanece asociada con la superficie de la miofibra en desarrollo como una SC muscular quiescente (Chargé y Rudnicki, 2004).

### **1.2.2. Fase de remodelación y reparación**

La fase final del proceso regenerativo se caracteriza por la remodelación del tejido conectivo, la angiogénesis y la recuperación funcional del músculo esquelético lesionado (Carosio *et al.*, 2011). Se ha demostrado que una vez dada la lesión muscular, la matriz extracelular es activada y crece en exceso, resultando en la sobreproducción de varios tipos de colágeno que contribuyen a la formación de una cicatriz (Carosio *et al.*, 2011). Esta respuesta fibrótica es inicialmente beneficiosa porque es rápida, adiciona soporte y ayuda a proteger el sitio de la lesión; sin embargo, la sobreproducción de colágenos dentro del área dañada a menudo conduce a la cicatrización en exceso y a la pérdida de la función muscular (Carosio *et al.*, 2011). Aunque el proceso de la formación de fibrosis no se conoce en detalle, el TGF $\beta$ 1 se ha identificado como un factor clave en la activación de la cascada de fibrosis en el músculo esquelético lesionado (Carosio *et al.*, 2011).

Procesos como la reinervación y la formación de nuevos vasos sanguíneos juegan un rol crítico en la determinación del potencial de regeneración del músculo lesionado (Turner y Badylak, 2012). El restablecimiento de nervios en el músculo en regeneración y la formación de nuevas placas terminales motoras, confieren un control funcional al nuevo músculo, y sus efectos quimiotrópicos y estimuladores influyen en el tipo de fibra muscular, su alineamiento y tamaño (Turner y Badylak, 2012). Si las conexiones neuromusculares no se restablecen, entonces el músculo regenerado termina atrófico (Turner y Badylak, 2012).

Una vez dada la lesión muscular, los vasos sanguíneos también son dañados severamente, y uno de los principales factores limitantes en la reparación del músculo esquelético es el requerimiento de nutrientes y de oxígeno por los mioblastos; de hecho, los

mioblastos son incapaces de proliferar o diferenciarse a una distancia mayor de 150  $\mu\text{m}$  de un vaso que sirva como fuente de nutrientes y oxígeno (Turner y Badylak, 2012).

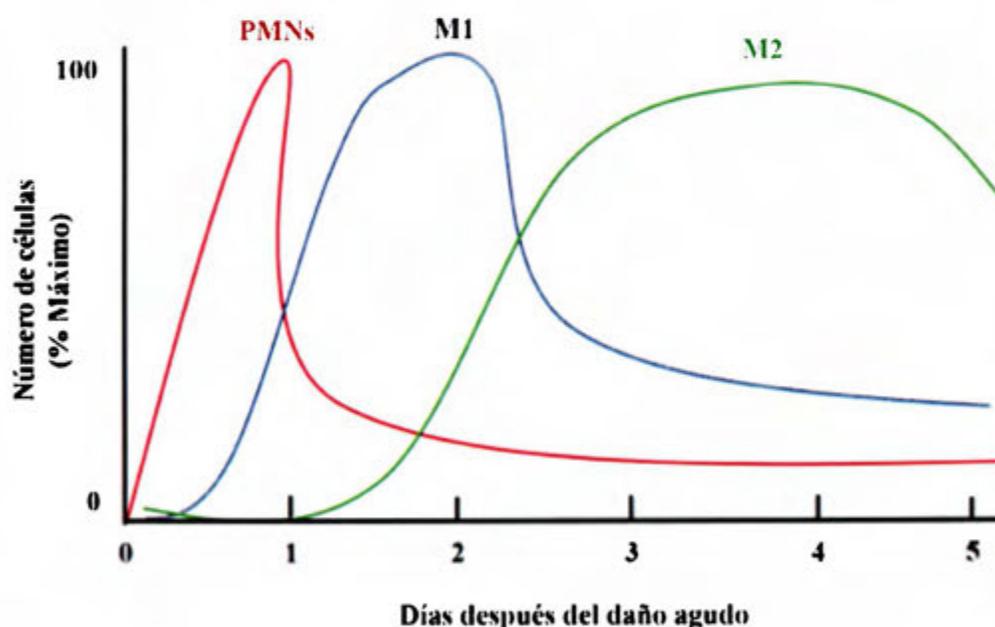
Además de proveer las condiciones ideales para los mioblastos, la angiogénesis puede activar SCs residentes y proveer un conducto a través del cual las células miogénicas progenitoras pueden viajar (Turner y Badylak, 2012). Las células del endotelio vascular de los vasos dañados liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento de hepatocitos; estos factores promueven la activación y proliferación de SCs (Fu *et al.*, 2015). Finalmente, los vasos sanguíneos restaurados posteriormente le señalan a las SCs activas regresar al estado quiescente (Fu *et al.*, 2015).

### **1.2.3. Papel del sistema inmune durante el proceso de regeneración muscular**

El daño muscular generado por trauma agudo, quemaduras, ejercicio, algunas enfermedades y toxinas, inicia con una respuesta inflamatoria en la que el número de leucocitos intramusculares pueden aumentar más de 100 veces (Tidball, 2017). La inflamación es claramente un componente crítico de la fisiología muscular y es una fase importante del proceso regenerativo (Carosio *et al.*, 2011). El daño a las fibras musculares activa la síntesis y liberación de moléculas de señalización en el espacio extracelular, las cuales pueden ser endógenas del tejido dañado o pueden ser sintetizadas y secretadas por otros tipos celulares en el sitio de la lesión (Tidball, 2011; Karalaki *et al.*, 2009). A la vez, estas moléculas pueden inducir la activación y atracción de una población diversa de células que promueven la regeneración muscular (Tidball, 2011; Karalaki *et al.*, 2009).

Específicamente, se da la infiltración del músculo dañado por células inflamatorias importantes en la mediación del daño, así como en la activación del proceso de reparación (Karalaki *et al.*, 2009). Las primeras células inflamatorias en invadir el tejido dañado son los PMNs (Ly6C+); se ha observado que el número de estas células aumenta entre 1 a 6 horas después del daño muscular, alcanzan el pico de su concentración 24 horas después de la

lesión (**Figura 3**), y entonces, regresan nuevamente a su número normal (Karalaki *et al.*, 2009; Tidball, 2011; Tidball, 2017). Este reclutamiento es vital tanto para la acción microbicida, como para atraer otros linfocitos capaces de resolver la inflamación y mediar el proceso de regeneración (De Filippo *et al.*, 2008). Los macrófagos residentes del tejido (F4/80+, LY6C+) promueven el flujo marcado de PMNs mediante la liberación de quimioatrayentes (Tidball, 2017), entre ellos, las quimiocinas murinas KC (CXCL1) y MIP2 (proteína inflamatoria de macrófagos 2 ó CXCL2) son los principales quimioatrayentes para el reclutamiento de PMNs (Lee *et al.*, 1995; De Filippo, 2008). Los PMNs inician el proceso de digestión de las miofibras necróticas y restos celulares por fagocitosis y liberan rápidamente altas concentraciones de radicales libres y proteasas (Turner y Badylack, 2012; Carosio *et al.*, 2011). Además, los PMNs secretan citoquinas proinflamatorias que reclutan SCs al sitio de la lesión y estimulan la llegada de macrófagos, promoviendo aún más la inflamación del tejido (Turner y Badylack, 2012; Carosio *et al.*, 2011).



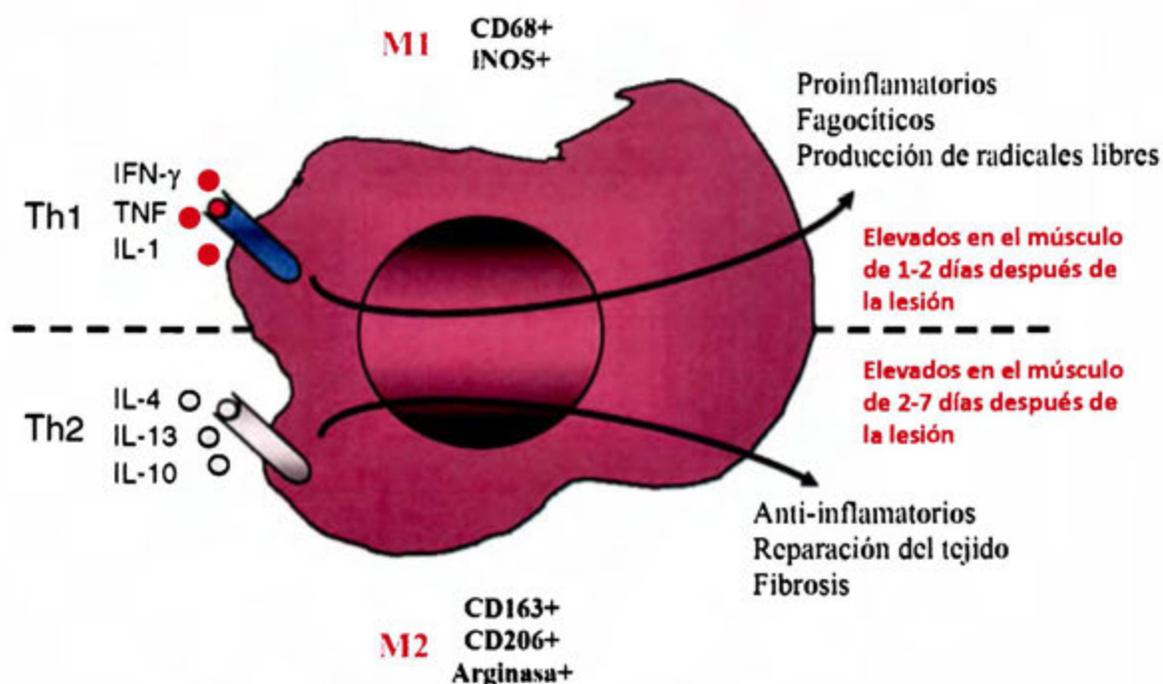
**Fig. 3. Tiempo relativo de invasión de las distintas células inflamatorias después de una lesión muscular.** Elaborado con base en lo descrito por Tidball, 2008 y Tidball, 2011. PMNs: Polimorfonucleares; M1: Macrófagos M1; M2: Macrófagos M2.

Aproximadamente dos días después del daño, los macrófagos son el tipo de célula inflamatoria predominante dentro del área afectada (**Figura 3**) (Carosio *et al.*, 2011). La proteína quimioatrayente de monocitos MCP1/CCL2, es una de las quimiocinas clave que regulan la infiltración de monocitos/macrófagos (Deshmane *et al.*, 2009); de hecho, muchas investigaciones han establecido la importancia de la señalización mediada por MCP1 en la inflamación y regeneración muscular (Lu *et al.*, 2011; Tidball, 2017).

Estudios sugieren que los macrófagos juegan un rol no sólo en la remoción del tejido dañado, sino también en la activación de la reparación y regeneración mediada por células madre (Karalaki *et al.*, 2009). De hecho, la inhibición de la respuesta inflamatoria o la alteración de la actividad fagocítica de las células mieloides perjudica el proceso regenerativo (Carosio *et al.*, 2011). Dos poblaciones distintas de macrófagos invaden secuencialmente el tejido muscular dañado (**Figuras 3 y 4**). Una población de macrófagos fagocíticos CD68+/CD163-/F4/80+ (macrófagos M1) siguen cercanamente la invasión de PMNs, alcanzando el máximo de su concentración aproximadamente a los dos días de la lesión, y posteriormente disminuyen en número (Tidball, 2011). La respuesta Th1 se caracteriza por la presencia de las citoquinas interleucina-1 (IL1), interleucina-2, interleucina-6 (IL6), interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), los cuales pueden promover la inmunidad celular, generalmente son proinflamatorios y conducen a la activación de macrófagos M1 (**Figura 4**) (Tidball, 2008). A su vez, los macrófagos M1 producen TNF $\alpha$ , IL1 e IL6, son capaces de dañar el tejido del hospedero mediante la liberación de radicales libres del oxígeno que pueden dañar las membranas celulares, fagocitan el tejido necrótico y promueven la proliferación de SCs (Carosio *et al.*, 2011; Turner y Badylack, 2012).

La respuesta Th2 involucra niveles elevados de IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13, las cuales pueden tener efectos anti-inflamatorios y desactivar los macrófagos M1 (Tidball, 2008). Adicionalmente, la IL4, IL10 y la IL13 juegan roles bien caracterizados en la activación de macrófagos no fagocíticos (**Figura 4**); específicamente la IL10 es una potente citoquina desactivadora que contribuye a la terminación de la respuesta inflamatoria y puede permitir a los macrófagos cambiar del fenotipo clásico al fenotipo alternativo (Tidball, 2008; Tidball

y Villalta, 2010). Los macrófagos no fagocíticos CD68-/CD163+/F480+/206+, conocidos como macrófagos M2, invaden el tejido y alcanzan su pico máximo cerca de los cuatro días después de la lesión, pero el número de estas células permanece elevado en el músculo dañado por periodos de hasta dos semanas (Tidball, 2011). Estos macrófagos remodeladores del tejido disminuyen la respuesta inflamatoria y promueven la angiogénesis, la proliferación de los mioblastos, su crecimiento y diferenciación (Carosio *et al.*, 2011; Turner y Badylack, 2012). La producción diferencial de citoquinas es una característica clave de los macrófagos polarizados: el fenotipo M1 expresa CD68, altos niveles de interleucina-12 (IL12) y bajos niveles de interleucina 10 (IL10), mientras que los macrófagos M2 expresan CD163, altos niveles de IL10 y bajos niveles de IL12 (Carosio *et al.*, 2011).



**Fig. 4.** Diagrama de los macrófagos activados al fenotipo M1 por citoquinas Th1 (parte superior) o al fenotipo M2 por citoquinas Th2 (parte inferior). Adaptado de Tidball, 2008.

Adicionalmente, la actividad de los macrófagos como células efectoras o inmunoreguladoras, depende del metabolismo de arginina que es prevalente en la respuesta inmune en curso (Rath *et al.*, 2014). Los macrófagos M1 expresan la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual metaboliza la arginina a óxido nítrico (NO) y citrulina; el NO puede ser metabolizado a otras especies reactivas del nitrógeno, mientras que la citrulina puede ser reutilizada en la síntesis eficiente de NO (Rath *et al.*, 2014). Por su parte, los macrófagos M2 expresan la enzima arginasa, la cual hidroliza la arginina a ornitina y úrea; esta última vía limita la disponibilidad de arginasa para la síntesis de NO, y la ornitina puede ser utilizada en otras rutas que conducen a la proliferación celular y a la reparación del tejido (Rath *et al.*, 2014).

Notablemente, la activación y la afluencia de PMNs fagocíticos y macrófagos M1 coinciden cercanamente con la activación, proliferación, y migración de SCs, sugiriendo el rol de estos fagocitos en estos procesos (Tidball, 2011). De modo similar, la presencia de invasores tardíos no fagocíticos M2, concuerda con el periodo terminal de diferenciación de las SCs en el músculo dañado, lo cual puede reflejar su función en la modulación de la regeneración y crecimiento del músculo lesionado (Tidball, 2011). La forma más probable en la que estas células regulen el proceso regenerativo es a través de la liberación de factores que influyen en el rol regenerativo de otras células, como las SCs (Tidball, 2008). Además, secretan citoquinas y factores de crecimiento que facilitan la reparación vascular y de fibras musculares, mediante el aumento de la expresión de genes que están involucrados en la remodelación del tejido conectivo y fibrosis, como procolágenos I y III, metaloproteinasas y arginasas (Tidball, 2008; Carosio *et al.*, 2011).

La estimulación por IFN $\gamma$  es esencial para la activación clásica del fenotipo Th1 (Tidball, 2008). El IFN $\gamma$  es una citoquina prototípica de la respuesta Th1 y un poderoso activador de PMNs y de macrófagos del fenotipo M1 (Tidball, 2017). Aunque el IFN $\gamma$  es visto como un producto solamente de células “natural killer” y de células T, los macrófagos M1 pueden ser inducidos para expresar altos niveles de IFN $\gamma$  en reacciones del sistema inmune innato; de modo que el IFN $\gamma$  puede tener un rol autocrino en la activación de

macrófagos M1 (Tidball, 2011; Tidball, 2017). Más aún, la estimulación de IFN $\gamma$  puede aumentar la respuesta de PMNs a citoquinas quimiotácticas, aumentando potencialmente su invasión a los sitios de la lesión (Tidball, 2011). Así, los niveles elevados de la expresión de IFN $\gamma$  que acompañan las lesiones musculares agudas y crónicas, tienen el potencial de amplificar la respuesta inmune innata y de exacerbar el daño muscular que ocurre durante la respuesta inflamatoria temprana Th1 (Tidball, 2011).

El IFN $\gamma$  puede también tener efectos positivos directos en la reparación y regeneración de las células musculares (Tidball, 2017). Estudios han demostrado que el incremento de la expresión de IFN $\gamma$  puede ser beneficioso en la reparación del músculo; de manera particular, la administración de anticuerpos neutralizantes al receptor de IFN $\gamma$  en ratones con lesiones musculares reduce significativamente el número de fibras con núcleo central y reduce el número de células que expresan MyoD (Tidball, 2011). Además, debido a que el IFN $\gamma$  es un fuerte activador de PMNs y de macrófagos M1, es de esperar que reducciones en la señalización de IFN $\gamma$ , disminuya el número y activación de células mieloides citotóxicas, afecte de este modo la respuesta inflamatoria y el proceso de regeneración muscular (Tidball, 2011).

Por su parte, el TNF $\alpha$  es otra citoquina Th1 altamente expresada por macrófagos M1, con potencial mitógeno y motógeno para las células del músculo esquelético (Tidball, 2017). Sin embargo, de manera similar a los efectos mediados por IFN $\gamma$ , el TNF $\alpha$  también puede promover daño muscular; la expresión de TNF $\alpha$  en el músculo alcanza su pico aproximadamente 24 horas después de la lesión, el cual coincide con la invasión de PMNs y macrófagos M1, y con el aumento del daño muscular secundario generado por células mieloides (Tidball, 2011). Parte del daño mediado por células mieloides a las fibras musculares es causado por el NO derivado de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el TNF $\alpha$  puede estimular a los macrófagos M1 a elevar la expresión de iNOS y así promover la lisis de las fibras musculares (Tidball, 2011).

El potencial del TNF $\alpha$  de promover la reparación y regeneración muscular, radica en su acción directa sobre las células musculares (Tidball, 2017). Estudios *in vitro* han mostrado que el TNF $\alpha$  dirige en parte la migración de SCs a los sitios de la lesión muscular e inflamación; también puede influir en la reparación y regeneración muscular mediante la modulación de la proliferación y diferenciación de SCs en el tejido dañado (Tidball, 2011). La aplicación de TNF $\alpha$  a células precursoras del músculo *in vitro*, aumenta su proliferación e inhibe su fusión, indicando que el TNF $\alpha$  puede mantener las SCs en un estado proliferativo, mientras migran al sitio de la lesión muscular para participar en la reparación del tejido (Tidball, 2011). Observaciones *in vivo* también indican un papel para TNF $\alpha$  en el mantenimiento de las células musculares en el ciclo celular; por ejemplo, mutantes nulos para TNF $\alpha$  y su receptor, muestran menores niveles de expresión de MyoD en comparación con el control, después de una lesión aguda del músculo (Tidball, 2011).

Muchos de los efectos del TNF $\alpha$  en células musculares durante las etapas tempranas de la reparación muscular pueden resultar de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B en las células musculares (Tidball, 2011). Este último se encuentra en el citoplasma en una forma inactiva cuando se une a inhibidores endógenos; la estimulación de las células con citoquinas Th1, como TNF $\alpha$  o IL1, causa la disociación de NF $\kappa$ B inactivo de sus inhibidores y entonces se transloca al núcleo celular, donde puede inducir la transcripción de citoquinas Th1 y otras moléculas proinflamatorias incluyendo iNOS, TNF $\alpha$  e IL1 (Tidball, 2011).

Otro de los factores importantes en el proceso de regeneración muscular es el TGF $\beta$ , el cual ha sido reconocido como modulador de la actividad de mioblastos (Chargé y Rudnicki, 2004). Las funciones de TGF $\beta$ 1, - $\beta$ 2, y - $\beta$ 3 durante la regeneración muscular son complejas, involucran la fusión de mioblastos, la regulación de la respuesta inmune y la supervivencia de las neuronas motoras (Chargé y Rudnicki, 2004). En general, la señalización del TGF $\beta$  juega un rol negativo en la regulación de la miogénesis mediante la represión de la expresión de MyoD y miogenina, se encuentra altamente expresado en SCs quiescentes y reprime el progreso del ciclo celular (Fu *et al.*, 2015).

Los PMNs y los macrófagos poseen actividad antimicrobiana incluso bajo condiciones anaerobias, por lo que en teoría, deben ser capaces de eliminar *C. perfringens* de las heridas contaminadas si el tejido es hipóxico (O'Brien *et al.*, 2007). En el caso de la gangrena gaseosa establecida por *C. perfringens*, el papel que juegan los PMNs y los macrófagos en la prevención del inicio de la infección, no ha sido definido claramente (O'Brien *et al.*, 2007).

Se necesita un inóculo de  $1 \times 10^9$  bacterias para establecer gangrena gaseosa por *C. perfringens* experimentalmente en animales, lo que sugiere que los fagocitos pueden jugar un papel en la inhibición de la gangrena gaseosa con inóculos menores (O'Brien *et al.*, 2007); experimentos en los que los ratones son depletados de monocitos circulantes o PMNs antes de la infección con *C. perfringens*, han demostrado que los monocitos juegan un rol en la inhibición del inicio de la gangrena gaseosa pero que, aunque los PMNs pueden ralentizar el inicio de la infección con inóculo intermedio, no son protectores (O'Brien *et al.*, 2007). Por otra parte, la examinación de secciones del tejido de ratones infectados con un inóculo letal ( $1 \times 10^9$  UFCs) o subletal ( $1 \times 10^6$  UFCs) de *C. perfringens*, ha revelado que la infiltración de fagocitos en las primeras 3 horas postinfección es inhibida con un inóculo letal pero no con un inóculo subletal (O'Brien *et al.*, 2007).

El uso de un inóculo subletal permite simular las etapas iniciales de una infección en humanos (O'Brien & Melville, 2004; O'Brien *et al.*, 2007); clínicamente, el inicio de la infección es una fase importante, debido a que una vez que la enfermedad progresa al punto donde esta es visualmente aparente, el debridamiento extensivo del tejido o la amputación en conjunto con el uso de antibióticos, serán los tratamientos de elección para prevenir la muerte del paciente (O'Brien *et al.*, 2007).

Dado que poco se conoce sobre la respuesta inflamatoria ante la infección generada por *C. perfringens* y no existen reportes sobre su influencia en el proceso de regeneración muscular posterior al daño generado por este patógeno, el presente trabajo tuvo como

objetivo caracterizar la respuesta inflamatoria y el proceso de regeneración muscular después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens*.

## JUSTIFICACIÓN

La gangrena gaseosa causada por *C. perfringens* es una de las infecciones necrotizantes más severas que afectan a los humanos (Stevens *et al.*, 2004). El choque multiorgánico ocurre en el 50% de los pacientes y de éstos el 40% muere (Stevens *et al.*, 2012). Actualmente, el tratamiento de la gangrena gaseosa se limita a la terapia con antibióticos, al debridamiento del tejido infectado y en muchos casos, a la amputación del miembro afectado (Chakravorty *et al.*, 2014). Inóculos de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  bacterias inducen rápidamente la infección en ratones (O'Brien *et al.*, 2007), e impiden estudiar procesos relacionados con la infección por más de 24 horas, lo cual sí se puede lograr con un inóculo subletal de  $10^6$  UFC.

Dado que los PMNs y los macrófagos poseen actividad antimicrobiana incluso bajo condiciones anaerobias, teóricamente deben ser capaces de eliminar *C. perfringens* de las heridas contaminadas; sin embargo, se ha sugerido que en la infección generada por *C. perfringens*, la actividad bactericida de las células fagocíticas juega un modesto papel en el control del progreso de la infección (O'Brien *et al.*, 2007). Por otra parte, existe una importante relación entre la respuesta inflamatoria y el proceso de regeneración muscular, no obstante, este proceso se desconoce en el caso de la mionecrosis generada por *C. perfringens*. Por lo anterior, en el presente trabajo se plantea caracterizar la respuesta inflamatoria inducida por un reto con un inóculo subletal de *C. perfringens*, así como el subsiguiente proceso de regeneración muscular, lo cual permitiría conocer más sobre la patogénesis de *C. perfringens* y rendir nuevos blancos para la intervención de esta enfermedad.

## **HIPÓTESIS**

La regeneración muscular en un modelo murino de gangrena gaseosa inducida con un inóculo subletal de *C. perfringens* es deficiente, producto de una respuesta inflamatoria aguda alterada.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar las fases aguda y crónica del daño muscular en un modelo murino de gangrena gaseosa inducida por un reto con un inóculo subletal de *Clostridium perfringens*.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar la lesión histopatológica inducida por un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens*.
2. Caracterizar la respuesta inflamatoria aguda inducida por un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens*.
3. Caracterizar el proceso de regeneración muscular después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Animales de experimentación

Se emplearon ratones CD1 de 18-20 g, según los protocolos establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUA-098-17) de la Universidad de Costa Rica.

### 2.2. Modelo murino de gangrena gaseosa

Se utilizó la cepa de *C. perfringens* JIR325, una cepa resistente a rifampicina y a ácido nalidíxico derivada por mutación espontánea de una cepa silvestre de *C. perfringens* (cepa 13), la cual es comúnmente utilizada en estudios de patogenicidad de este microorganismo (Liristis *et al.*, 1994; Brynestad *et al.*, 2001). El modelo de gangrena se realizó según se ha descrito previamente (Awad *et al.*, 1995; Monturiol-Gross *et al.*, 2012). Cultivos de *C. perfringens* en caldo infusión cerebro-corazón (BHI), crecieron dentro de una cámara de anaerobiosis a una densidad óptica con la cual se alcanzó un recuento de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) por cada 100  $\mu$ l. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron, se les realizaron dos lavados con buffer fosfato salino (PBS) estéril frío y el botón obtenido se resuspendió en PBS estéril frío. Se realizaron recuentos en placas de agar BHI suplementado con yema de huevo para verificar el número y pureza del cultivo. Se trabajaron dos grupos de ratones, el primero inoculado con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y el segundo, un control negativo inyectado con PBS estéril para evaluar alteraciones por el daño mecánico. Los grupos fueron inyectados intramuscularmente en el músculo gastrocnemius de la pata izquierda con 100  $\mu$ L del inóculo de *C. perfringens*, o con 100  $\mu$ L de PBS estéril en el caso del control negativo.

### **2.3. Caracterización del daño muscular agudo después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

#### **2.3.1 Determinación de CK en plasma**

Se tomaron muestras de sangre de los dos grupos de animales durante la fase aguda de la infección (5 h y 24 h) y se determinó la actividad CK en plasma con el kit comercial “CK-NAC UV Unitest” (Wiener Lab, Argentina), según las indicaciones del fabricante.

#### **2.3.2 Análisis histológico del daño muscular agudo mediante microscopía de luz**

Animales de los dos grupos fueron sacrificados en tiempos que cubrieron la fase aguda de la infección (1 h y 5 h, 1 d y 3 d). Cada músculo gastrocnemius inyectado se disecó y se colocó en solución fijadora de zinc a 4°C durante al menos 48 h. Posteriormente, el tejido se deshidrató en etanol, se colocó en xileno y finalmente en parafina. Se realizaron 3 cortes de la región media de cada músculo de 4 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos. Se procedió a desparafinar las secciones en xileno, a hidratar con agua destilada y a realizar una tinción con hematoxilina y eosina (HE), para su evaluación en un microscopio OLYMPUS BX51. Se capturaron imágenes aleatorias de cada sección haciendo uso de una cámara “Evolution MP” (Media Cybernetics, USA) para su análisis mediante el programa computacional “Image Pro 6.3” (Media Cybernetics, USA).

#### **2.3.3. Determinación de la persistencia de *C. perfringens* en el músculo**

Animales de los dos grupos fueron sacrificados a los 1 d, 5 d y 9 d después de la infección. Cada músculo gastrocnemius inyectado se disecó en condiciones asépticas, se pesó y se cortó finamente en una placa de Petri con navajas estériles, se suspendió en PBS estéril, se agitó con ayuda de un vórtex y se realizaron diluciones seriadas; 100 µl de cada dilución se sembraron por duplicado en placas de agar BHI suplementado con yema de huevo y se determinó el número de UFC por mg del tejido infectado.

## **2.4. Caracterización de la respuesta inflamatoria aguda después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

### **2.4.1. Determinación de la expresión de moléculas inflamatorias mediante PCR-RT**

Se determinó la expresión relativa de transcritos codificantes para IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, IL13, IL10, MIP2, KC y MCP1. Para ambos grupos de animales, se disecaron los músculos en tiempos definidos (6 h, 1 d, 2 d, 3 d y 6 d) bajo condiciones asépticas y se realizó la extracción de ARN. De manera general, cada músculo se cortó finamente en una placa de Petri en el reactivo “TRIzol®Reagent” (ambion, Invitrogen) y la suspensión obtenida se recuperó y se colocó en TRIzol. Posteriormente se adicionó cloroformo frío, se agitó vigorosamente y se incubó en frío durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó la mezcla a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se adicionó isopropanol frío, se agitó y se incubó a -20°C durante al menos 16 h. Se prosiguió con la precipitación de ARN, para la cual se centrifugó la mezcla a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol frío para volver a centrifugar a 4°C. Posterior a la centrifugación, se eliminó completamente el etanol de las muestras para resuspender el ARN en agua libre de nucleasas y determinar su pureza mediante la relación 260/280 en el “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (Thermo Scientific, USA). Aquellas muestras con una relación 260/280 igual o mayor a 1.8 fueron seleccionadas para continuar con la retrotranscripción. Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit comercial “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), según las indicaciones del fabricante, haciendo uso de un termociclador “2720 Thermal Cycler” (Applied Biosystems).

Para la cuantificación relativa de los genes de interés se utilizaron los primers especificados en el Cuadro 1 y el kit comercial “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” (Roche Diagnostics), adicionando para cada mezcla de reacción 160 ng del respectivo ADNc. Las reacciones se procesaron en un equipo “LightCycler® 480” (Roche Diagnostics) con el siguiente programa de amplificación: 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 10 s, 72 °C durante 10 s; lo anterior por 40 ciclos. Para cada gen de interés, se comparó su expresión en animales

infectados con *C. perfringens* respecto a su expresión en animales control, haciendo uso de la cuantificación relativa. Se tomaron como genes de referencia genes utilizados previamente en estudios realizados con músculos murinos: la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Sachdev *et al.*, 2014), la proteína S1 de unión al ácido ribonucleico (RNSP1) (Villalta *et al.*, 2011a) y la proteína ribosomal L13A (RPL13A) (Villalta *et al.*, 2011a) (**Cuadro 1**), y se realizó un promedio con los resultados obtenidos de los tres genes de referencia, para los diferentes tiempos.

**Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de la respuesta inflamatoria inducida con un inóculo subletal de *C. perfringens* mediante PCR-RT**

<b>Gen</b>		<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Tamaño del amplicón (pb)</b>	<b>Referencia</b>
<b>MIP2</b>	Fwd	AGGGCGGTCAAAAAGTTTGC	194	Palomo <i>et al.</i> , 2016
	Rev	CGAGGCACATCAGGTACGAT		
<b>KC</b>	Fwd	GCTGGGATTCACCTCAAGAA	180	Lee <i>et al.</i> , 2015
	Rev	TCTCCGTTACTTGGGGACAC		
<b>MCPI</b>	Fwd	ATGCAGTTAATGCCCACTC	167	Thacker <i>et al.</i> , 2009
	Rev	TTCCTTATTGGGGTCAGCAC		
<b>IL6</b>	Fwd	GAACAACGATGATGCACTTGC	154	Villalta <i>et al.</i> , 2011b
	Rev	CTTCATGTACTCCAGGTAGCTATGGT		
<b>IL10</b>	Fwd	CAAGGAGCATTTGAATTCCC	157	Villalta <i>et al.</i> , 2011a
	Rev	GGCCTTG TAGACACCTTGGTC		
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fwd	CTTCTGTCTACTGAACTTCGGG	163	Villalta <i>et al.</i> , 2011b
	Rev	CACTTGGTGGTTTGCTACGAC		
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Fwd	TGCTGATGGGAGGAGATGTCT	101	Han <i>et al.</i> , 2012
	Rev	TTTCTTTTCAGGGACAGCCTGTT		
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Fwd	TGACGTTCCATTAGACA ACTG	231	Cheng <i>et al.</i> , 2008
	Rev	CCGTCTTTCATTACACAGGACA		
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	Fwd	GAGACGGAATACAGGGCTTTC	240	Arnold <i>et al.</i> , 2007
	Rev	TCTCTGTGGAGCTGAAGCAAT		
<b>IL13</b>	Fwd	TCTTGCTTGCCTTGGTGGTCTCGC	220	Barbara <i>et al.</i> , 2001
	Rev	GATGGCATTGCAATTGGAGATGTTG		
<b>GAPDH</b>	Fwd	AACCTGCCAAGTATGATGAC	191	Sachdev <i>et al.</i> , 2014
	Rev	ATACCAGGAAATGAGCTTGA		
<b>RPL13A</b>	Fwd	CCTGCTGCTCTCAAGGTTGTT	146	Villalta <i>et al.</i> , 2011a
	Rev	CGATAGTGCATCTTGGCCTTT		
<b>RNSP1</b>	Fwd	AGGCTCACCAGGAATGTGAC	196	Villalta <i>et al.</i> , 2011a
	Rev	CTTGCCATCAATTTGTCCT		

#### **2.4.2. Determinación de la expresión de moléculas inflamatorias mediante ELISAs de captura**

Se realizaron pruebas de ELISA para cuantificar IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, IL4 e IL10. Para los dos grupos de animales, se disecaron los músculos gastrocnemius inyectados en tiempos definidos (6 h, 1 d, 2 d, 3 d y 6 d), se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se maceraron en solución salina estéril libre de pirógenos con un inhibidor de proteasas (“Complete, EDTA-free”, Roche Diagnostics). Posteriormente, se centrifugaron los lisados a 4°C y el sobrenadante se congeló a -70°C hasta su análisis haciendo uso de kits comerciales para ELISA según las indicaciones del fabricante (R&B Systems, USA; eBioscience, San Diego, CA, USA). De manera general, después de cubrir la placa con el anticuerpo de captura (según se indicara), se adicionaron el estándar, control o muestra en el respectivo diluyente al pozo respectivo y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Posterior a la incubación, se aspiró el contenido de cada pozo, se realizaron 5 lavados y se adicionó el anticuerpo de detección respectivo para incubar durante 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 5 lavados, se adicionó la solución sustrato y se incubó durante 30 min. Seguidamente, se adicionó solución de detención, para determinar la densidad óptica utilizando un lector de microplacas a 450 nm. El cálculo de la concentración de cada factor o citoquina se realizó según las indicaciones del fabricante del kit, mediante la creación de una ecuación lineal a partir de la concentración de los estándares utilizando el programa computacional “Microsoft Excel” (Microsoft® Office), con R<sup>2</sup> mayores a 0.98.

#### **2.4.3. Detección de distintas células inflamatorias mediante inmunohistoquímica de fluorescencia**

Para determinar la presencia y permanencia de distintas células inflamatorias, animales de los dos grupos experimentales fueron sacrificados durante la fase aguda (1 h, 3 h y 5 h, 1 d y 3 d) y durante la fase crónica (5 d, 7 d y 14 d) de la infección. Se disecaron los músculos gastrocnemius inyectados y se incluyeron en parafina como se describió previamente. Se realizaron tres cortes de la región media de cada músculo de 4  $\mu$ m de grosor,

se colocaron en portaobjetos cargados positivamente para luego desparafinar las secciones histológicas en xileno e hidratarlas en agua destilada. Se procedió a realizar la tinción según correspondiera a PMNs con anticuerpos “Anti-Neutrophil Elastase Rabbit pAb” (Cat. No. 481001; EMD Millipore), macrófagos M1 con anticuerpos “anti-iNOS” (Cat. No. ab15323; Abcam, USA) y macrófagos M2 con anticuerpos “anti-arginase” (Cat. No. ab60176; Abcam, USA). En el caso de la tinción de PMNs, la exposición de antígenos fue realizada en buffer citrato pH 6 a 50°C durante 10 min; se bloquearon los cortes con “Dako Cytomation Biotin Blocking System” (Dako, USA) así como con el reactivo “Protein Block Serum-Free” (Dako, Denmark). El anticuerpo primario se diluyó 1:50 en “Antibody Diluent with Background-Reducing Components” (Dako, Denmark) y se incubó durante toda la noche a 4°C; posteriormente las secciones se incubaron con un anticuerpo “Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated” (Cat. No. E0432; Dako, Denmark) diluido 1:200 durante 1 h, y luego durante 30 min con un conjugado “Streptavidin, Alexa Fluor™ 488” ( $\lambda$ máxima de excitación/emisión: 495/519 nm) (Cat. No. S11223; Invitrogen) diluido 1:200. Finalmente, se realizó la tinción de núcleos con “bis BENZIMIDE Hoechst” ( $\lambda$ máxima de excitación: 343 nm) (Cat. No. 33258; Sigma, USA) a una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL. Para la tinción de macrófagos M1, se realizó el protocolo descrito para PMNs con las siguientes variaciones: la exposición de antígenos se realizó con “Proteinase K” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 0.6 U/mL durante 5 min, además, el anticuerpo primario respectivo se diluyó 1:75. En la tinción de macrófagos M2, la exposición de antígenos se realizó con “Proteinase K” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) y el bloqueo con “Protein Block Serum-Free” (Dako, Denmark). Posteriormente, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario correspondiente, diluido 1:50 durante toda la noche a 4°C. Luego se procedió a incubar con el anticuerpo secundario “Donkey F(ab')<sub>2</sub> Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor®488) preadsorbed” ( $\lambda$ máxima de excitación/emisión: 495/519 nm) (Cat. No. ab150137; Abcam, USA) diluido 1:200, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una tinción nuclear con “bis BENZIMIDE Hoechst” (Sigma, USA).

Para las tres tinciones, se incorporó como control un corte histológico de cada músculo infectado, el cual se sometió al mismo protocolo de tinción a excepción de los anticuerpos primarios, los cuales fueron sustituidos por PBS para descartar cualquier tinción inespecífica. Además, secciones histológicas de músculos sanos (controles negativos), también fueron sometidas a los protocolos de tinción sin variación alguna, para verificar que las células observadas en los músculos lesionados fuesen inducidas por la infección.

Se tomaron imágenes de la totalidad de cada sección haciendo uso de una cámara “Evolution MP” (Media Cybernetics, USA) para su análisis con el programa computacional “Image Pro 6.3” (Media Cybernetics, USA). Para los tres tipos celulares, se determinó el número de células por mm<sup>2</sup> de tejido en zonas donde eran evidentes, tanto dispersos como en agregados.

## **2.5. Caracterización del proceso de regeneración muscular después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

### **2.5.1. Análisis histológico de la regeneración muscular mediante microscopía de luz**

Para caracterizar el proceso de regeneración se realizó el análisis histológico mediante microscopía de luz descrito previamente, durante la fase crónica de la infección (5 d, 7 d, 14 d y 30 d). A partir de secciones teñidas con HE, se determinó el porcentaje del área necrótica a las 24 h, el área no regenerada y regenerada a los 14 d y 30 d, así como el número y diámetro de las fibras regenerativas a los 30 d. Se consideró como área necrótica el tejido abarcado por fibras dañadas, hialinas e hipercontraídas, con áreas citoplasmáticas aparentemente carentes de miofibrillas; el área no regenerada se definió por la presencia de restos celulares y tejido fibroso, mientras que para el área regenerada se tomó en cuenta el área abarcada por fibras regenerativas con núcleo central. El análisis se realizó observando la totalidad de las secciones histológicas y delimitando áreas según los criterios definidos con el programa computacional “Image Pro 6.3” (Media Cybernetics, USA). Además, se determinó de manera específica el incremento en colágeno (fibrosis) con la tinción rojo sirio según el protocolo

optimizado por Hernández *et al.* (2011), en el cual secciones histológicas de todos los tiempos, se tiñeron con Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, USA) (0.1% en una solución saturada de ácido pícrico) y Fast Green FCF 0.1% (Sigma-Aldrich, USA), durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las láminas fueron lavadas en agua acidificada (5 mL de ácido acético glacial por litro de agua destilada), deshidratadas y aclaradas en xileno. Se cuantificó el porcentaje del tejido total relacionado con deposición de colágeno (fibrosis) a los 30 d, haciendo uso del programa computacional “ImageJ 1.51K” (National Institutes of Health, USA).

### **2.5.2. Análisis de la densidad de vasos capilares y nervios mediante inmunohistoquímica de fluorescencia**

Animales de los dos grupos experimentales fueron sacrificados durante la fase aguda de la infección (6 h, 1 d y 3 d) y durante la fase crónica (30 d). Se disecaron los músculos gastrocnemius inyectados y se incluyeron en parafina como se describió previamente. Se realizaron tres cortes de la región media de cada músculo de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, se colocaron en portaobjetos cargados positivamente para desparafinar las secciones histológicas en xileno e hidratarlas en agua destilada. Se procedió a realizar la tinción según correspondiera a nervios con el anticuerpo “Anti-200 kD Neurofilament Heavy antibody-Neuronal Marker” (Cat. No. ab8135; Abcam, USA), o a vasos capilares con el anticuerpo “Purified anti-mouse Flk-1 (IHC)” (Cat. No. 555307; BD Pharmingen™).

Para la tinción de nervios, se utilizó el protocolo descrito previamente para la inmunotinción de PMNs, modificando la exposición de antígeno, la cual se realizó con “Proteinase K” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), y la dilución del anticuerpo primario respectivo (1:1000). Posterior a la tinción se determinó el número de nervios por  $\text{mm}^2$  en la totalidad del tejido y el número de axones por  $\mu\text{m}^2$  en cada nervio, considerando estructuras con un área entre 50 y 8000  $\mu\text{m}^2$ , y excluyendo aquellas localizadas en la periferia del tejido, haciendo uso de una cámara Evolution MP (Media Cybernetics, USA) y del programa “Image Pro 6.3” (Media Cybernetics, USA).

En el caso de los vasos sanguíneos, se utilizó el kit comercial “Biotin-XX Tyramide SuperBoost™Kit” (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, después de desparafinar las secciones histológicas, se realizó la exposición de antígeno con “Proteinase K” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se evitaron uniones inespecíficas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) durante 30 min, con el “Dako Cytomation Biotin Blocking System” (Dako, USA) durante 10 min por solución y con el “Protein Block Serum-Free” (Dako, Denmark) durante 1 h. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:50, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se adicionó el “Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated” (Cat. No. E0432; Dako, Denmark) diluido 1:200, durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por el conjugado “HRP-streptavidin” durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó la “Tyramide working solution” durante 5 min, el “stop reagent” y el “Streptavidin, Alexa Fluor™ 488” (Cat. No. S11223; Invitrogen) diluido 1:300 durante 30 min. Los vasos capilares se identificaron como estructuras redondas y huecas, ubicadas en la periferia de las células musculares, con un diámetro máximo de 12 µm; se determinó el número de vasos capilares por mm<sup>2</sup> en la totalidad del tejido y la relación entre vasos capilares y fibras musculares, haciendo uso de una cámara Evolution MP (Media Cybernetics, USA) y del programa “Image Pro 6.3” (Media Cybernetics, USA).

Para ambas tinciones, se incorporó como control negativo un corte histológico de cada músculo infectado, el cual se sometió al mismo protocolo de tinción a excepción de los anticuerpos primarios, los cuales fueron sustituidos por PBS para descartar cualquier tinción inespecífica. Además, secciones histológicas de músculos sanos (controles negativos), también fueron sometidas a los protocolos de tinción sin variación alguna, para verificar que las alteraciones observadas en los músculos lesionados fuesen inducidas por la infección.

## **2.6. Análisis estadístico**

Para los análisis de la actividad CK y de la respuesta inflamatoria mediante PCR-TR y ELISAs, se determinó si hubo o no diferencias significativas en diferentes tiempos respecto

al control, mediante pruebas de Kruskall Wallis y un análisis posthoc con la prueba de Dunn. En los estudios del proceso de regeneración muscular que involucraron medición de áreas, cuantificación de fibras musculares, vasos capilares y nervios, se aplicaron pruebas de Mann-Whitney. Lo anterior haciendo uso de los programas estadísticos IBM®SPSS Statistics® y GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se reportan los resultados como las medias  $\pm$  el error estándar (SE).

## RESULTADOS

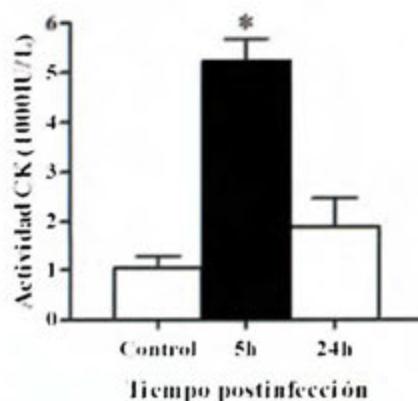
### 3.1. Caracterización del daño muscular agudo después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens*

#### 3.1.1. Daño muscular inducido por un inóculo subletal de *C. perfringens*

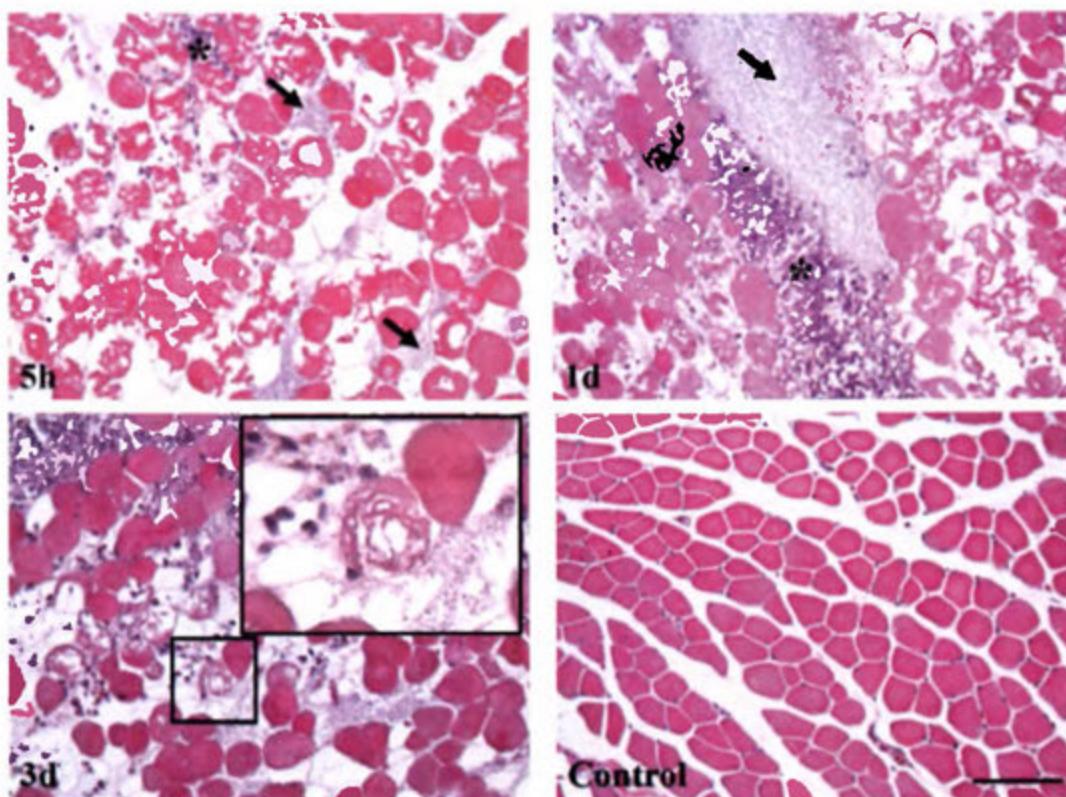
La CK es un indicador característico del daño al músculo (Kristjansson *et al.*, 2016), por lo que se utilizó para determinar la lesión muscular inducida por una dosis subletal de *C. perfringens*. En animales retados con *C. perfringens* se observó un aumento significativo de la CK 5 h después de la infección ( $p < 0.01$ ), mientras que a las 24 h la actividad se redujo y no mostró una diferencia significativa respecto al control (**Figura 5A**).

Análisis histológicos del músculo infectado mediante microscopía de luz, mostraron áreas de mionecrosis caracterizadas por material miofibrilar hialino y contracción de las miofibras desde las 5 h (**Figura 5B**); además, fueron evidentes agregados bacterianos entre las fibras musculares e infiltrado inflamatorio distribuido de manera no homogénea en el tejido, sin acumulación de leucocitos dentro de las vénulas (**Figura 5B**). Características similares se observaron a las 24 h y 3 d, con mayor cantidad de células inflamatorias dispersas en el tejido y otras en grandes agregados, colocalizadas en algunas áreas con la bacteria (**Figura 5B**). En el grupo control, los músculos de los animales inyectados con PBS estéril mostraron un patrón histológico normal.

A



B

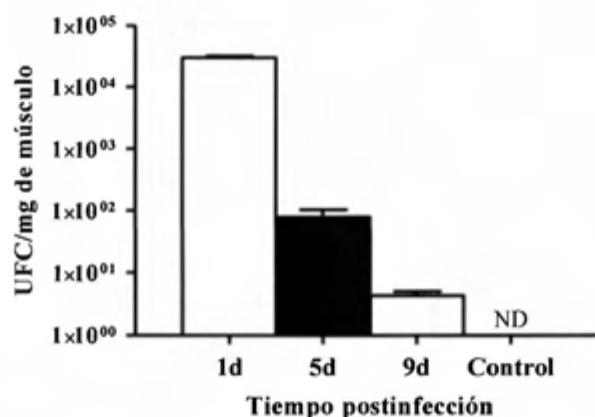


**Fig. 5. Mionecrosis causada por la infección con un inóculo subletal de *C. perfringens*.** Grupos de 6 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens*. (A) La actividad CK se determinó en plasma 5 h y 24 h después de la infección. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.01$  para muestras que difieren estadísticamente del control. (B) Músculos inyectados fueron evaluados histológicamente en la fase aguda de la infección, las secciones fueron teñidas con HE. Las flechas señalan

bacterias en medio de células necróticas, mientras que los asteriscos señalan la presencia de infiltrado inflamatorio. La bacteria continúa presente inclusive a los 3 d (recuadro). Los animales control fueron inyectados con PBS estéril. La escala de la barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2. Persistencia de *C. perfringens* en el músculo infectado con un inóculo subletal de la bacteria

Dado que en el análisis histológico se observó que la bacteria persiste en el tejido a los 3 d, se realizaron recuentos de UFC en placa hasta tiempos tardíos después de la infección, a partir de los músculos infectados. A las 24 h se cultivaron aproximadamente  $3 \times 10^4$  UFC (un 3% del inóculo inicial) del tejido, a los 5 d  $8 \times 10^2$  UFC y aunque en bajo número, a los 9 d fue posible recuperar en promedio 4 UFC (**Figura 6**).



**Fig. 6.** Persistencia de bacterias en el tejido luego de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Grupos de 4 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y se determinaron las UFC a partir de gastrocnemius de los animales inyectados 1 d, 5 d y 9 d después de la infección. El control fue inyectado con PBS estéril. ND: No detectado.

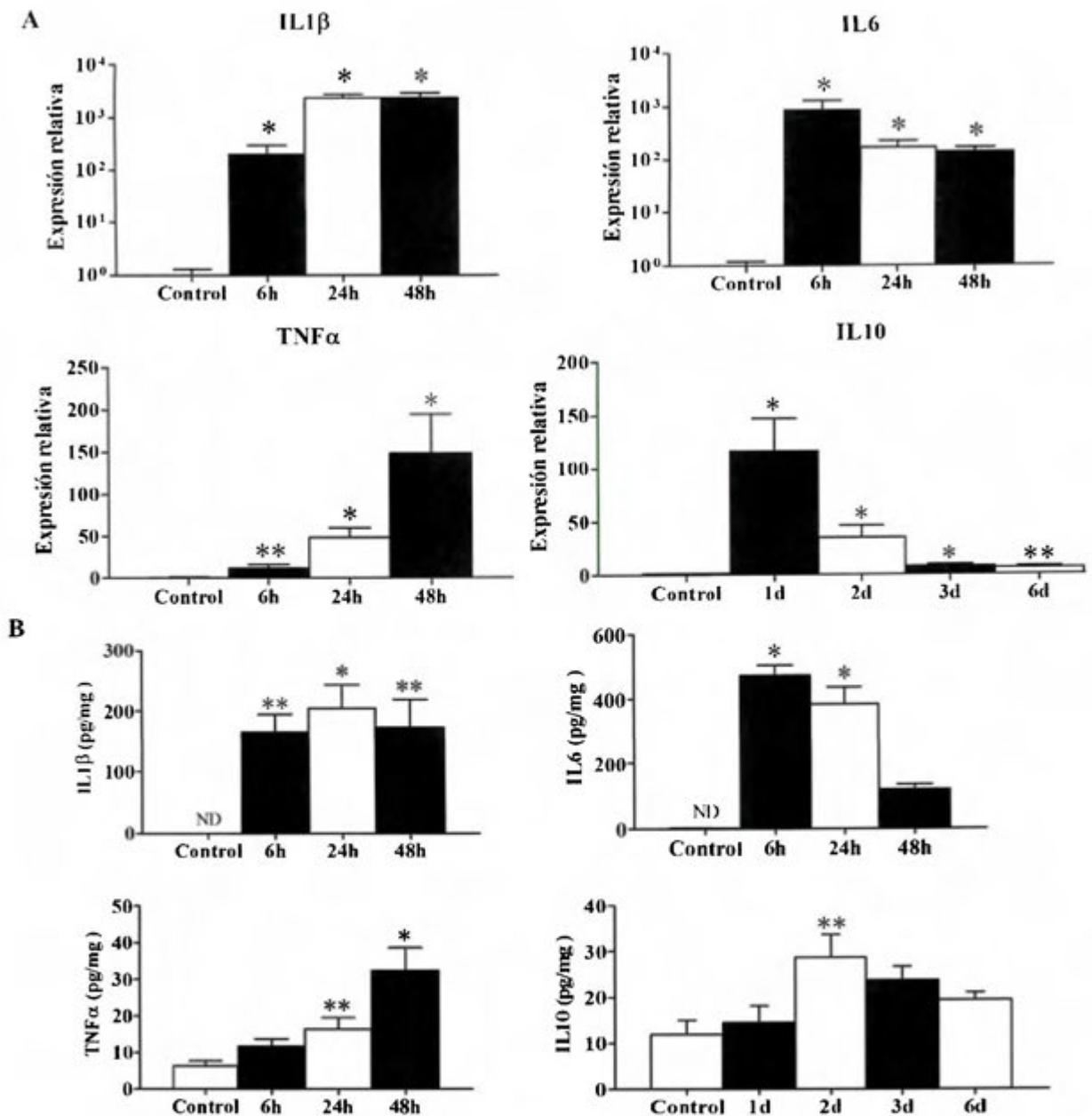
### **3.2. Caracterización de la respuesta inflamatoria aguda después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

#### **3.2.1. Expresión de genes de moléculas asociadas con la respuesta inflamatoria después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

Para evaluar alteraciones en la respuesta inflamatoria después de un reto con una dosis subletal de *C. perfringens*, se analizaron a nivel transcripcional y proteico citoquinas proinflamatorias (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) y anti-inflamatorias (IL4, IL10, IL13), así como moléculas quimioatrayentes de PMNs (MIP2 y KC) y de macrófagos (MCP1). Se determinó la expresión de las citoquinas mencionadas mediante PCR-RT y ELISAs, en tiempos en los que se reporta su expresión en otras lesiones musculares (Tidball, 2008; Tidball, 2011; Tidball, 2017).

En relación con las citoquinas proinflamatorias, se observó un aumento significativo respecto al control para IL1 $\beta$  e IL6 desde las 6 h, y su expresión se mantuvo elevada hasta por al menos 48 h ( $p < 0.01$ ). En el caso del TNF $\alpha$ , su expresión también mostró una diferencia significativa desde las 6 h ( $p < 0.05$ ) y ésta aumentó en el tiempo hasta las 48 h ( $p < 0.01$ ) en los animales infectados (**Figura 7A**). Al analizar las citoquinas anti-inflamatorias, se observaron diferencias significativas en la expresión de IL10 en comparación a la del grupo control desde las 6 h ( $p < 0.01$ ) hasta los 6 d ( $p < 0.05$ ), alcanzando un pico máximo 24 h después de la infección ( $p < 0.01$ ) (**Figura 7A**).

A nivel de expresión proteica se evidenciaron resultados similares, la concentración de IL1 $\beta$  se mantuvo elevada hasta las 48 h, la IL6 aumentó significativamente a las 6 h y 24 h ( $p < 0.01$ ), y se mantuvo elevada hasta las 48 h, mientras que el TNF $\alpha$  aumentó desde las 6 h y a las 48 h ( $p < 0.01$ ) se observó un pico máximo. Por su parte, la IL10 mostró un aumento significativo 2 d después de la infección ( $p < 0.05$ ) y se mantuvo elevada hasta los 6 d (**Figura 7B**).

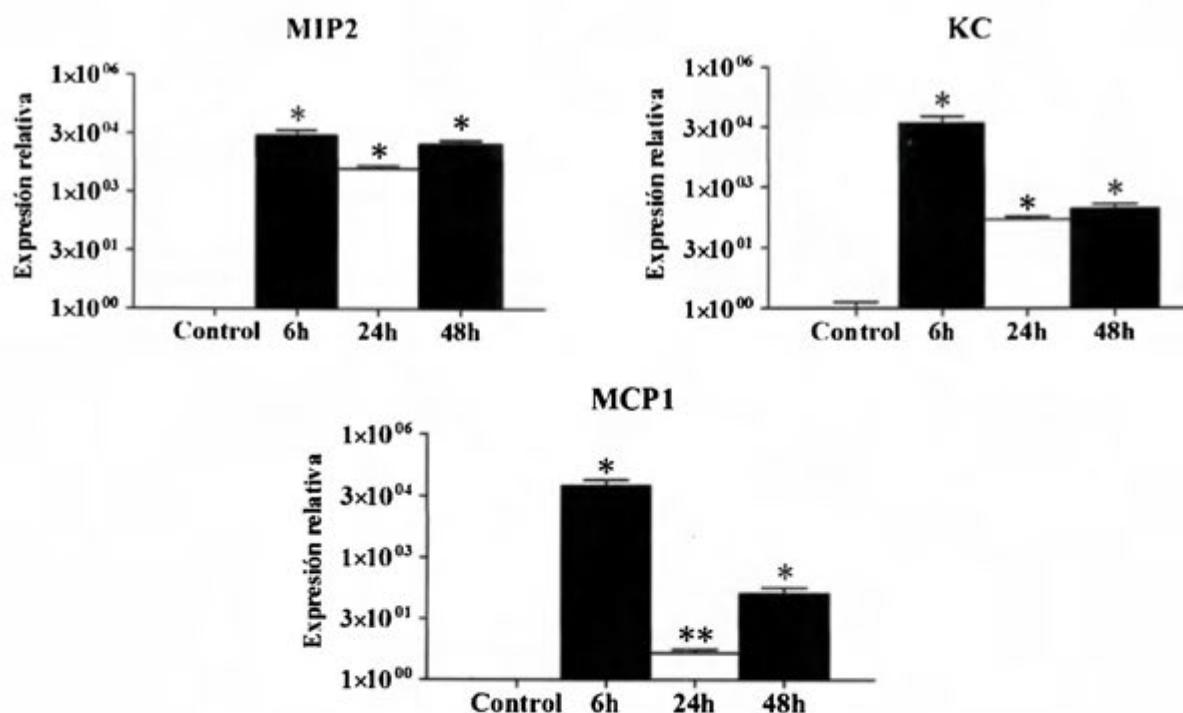


**Fig. 7.** Expresión de citoquinas en gastrocnemius de animales después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Grupos de 4-6 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $6 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y se determinó la expresión de citoquinas en los músculos infectados mediante PCR-RT (A) y ELISAs (B), en distintos tiempos. En (A) se consideraron en conjunto los resultados de normalización con GAPDH, RNSP1 y RPL13A. El control fue inyectado con PBS estéril. Los resultados

representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.05$ , para muestras que difieren estadísticamente del control.

El IFN $\gamma$  sólo mostró un aumento significativo a nivel de expresión génica a las 6 h postinfección ( $p < 0.01$ ), mas no a nivel proteico (datos no mostrados). No se evidenciaron diferencias significativas en la expresión de IL4, mientras que para la IL13, en el análisis a nivel de expresión génica se observaron diferencias significativas a los 6 d postinfección ( $p < 0.05$ ) (datos no mostrados).

Cuando se analizó la expresión de las moléculas quimioatrayentes, las quimiocinas MIP2 y KC mostraron niveles de expresión elevados significativamente respecto al control, desde las 6 h hasta las 48 h analizadas ( $p < 0.01$ ) (**Figura 8**). Igualmente MCP1, aunque mostró una disminución a las 24 h postinfección, mantuvo una expresión significativamente superior a la observada en el control (**Figura 8**).



**Fig. 8.** Expresión de quimioatrayentes en gastrocnemius de animales después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Grupos de 4-6 ratones

CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $6 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y se determinó la expresión de quimioatrayentes en los músculos infectados mediante PCR-RT, en distintos tiempos. Se consideraron en conjunto los resultados de normalización con GAPDH, RNSP1 y RPL13A. El control fue inyectado con PBS estéril. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.05$ , para muestras que difieren estadísticamente del control.

### **3.2.2. Detección de células inflamatorias después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

Los PMNs son las primeras células en llegar al sitio de infección ante un evento inflamatorio y son seguidos por distintas poblaciones de macrófagos para una buena resolución de la infección (Tidball, 2017). Por lo anterior, complementario al análisis de moléculas relacionadas con la respuesta inmune, se determinó la presencia de poblaciones celulares inflamatorias asociadas a las mismas en tiempos determinados, mediante anticuerpos específicos contra PMNs (anti-elastasa), macrófagos M1 (anti-iNOS) y macrófagos M2 (anti-arginasa).

En el caso de la gangrena gaseosa generada por *C. perfringens*, se ha reportado que los PMNs quedan adheridos al endotelio; sin embargo, debido a que con un inóculo subletal se observó infiltrado inflamatorio disperso de manera no homogénea en el tejido, se verificó que en efecto parte del mismo correspondiera a PMNs. Se evidenció la presencia de estas células inflamatorias desde las 5 h después de la infección (**Figura 9A**), donde alcanzaron un número de  $505.2 \pm 38$  células por  $\text{mm}^2$  (**Figura 9B**). A las 24 h su número fue  $548.4 \pm 56.40$  células por  $\text{mm}^2$ , a los 3 d  $342.2 \pm 36.57$  células por  $\text{mm}^2$  y a los 5 d posteriores a la infección se cuantificaron  $81.68 \pm 9.87$  células por  $\text{mm}^2$  (**Figura 9A y 9B**). Las células se observaron tanto en agregados, como dispersas en el tejido dañado, lo cual concuerda con la descripción histológica previa.

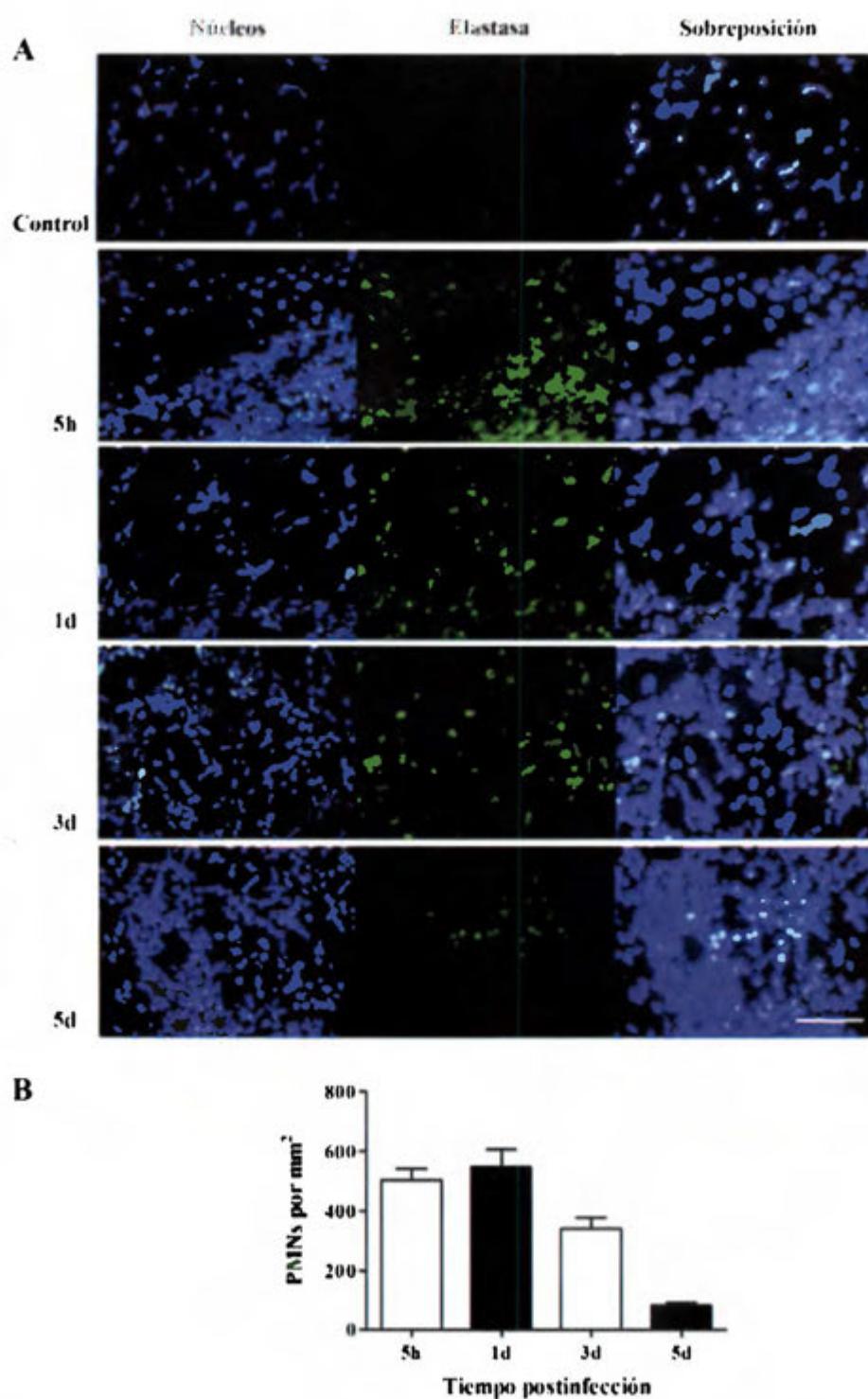
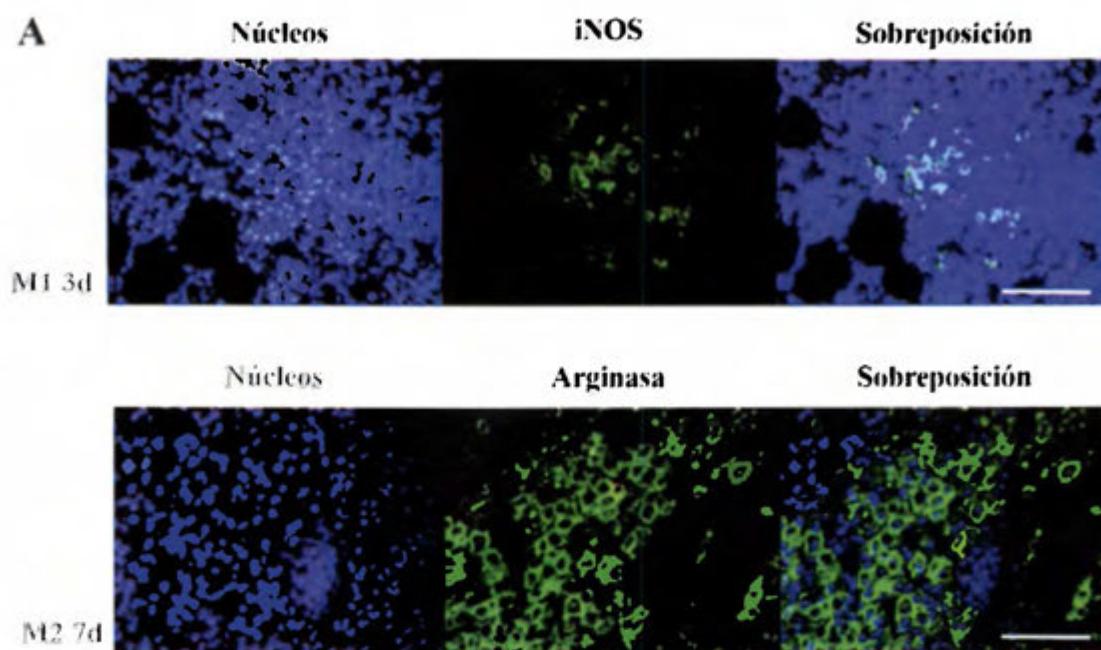


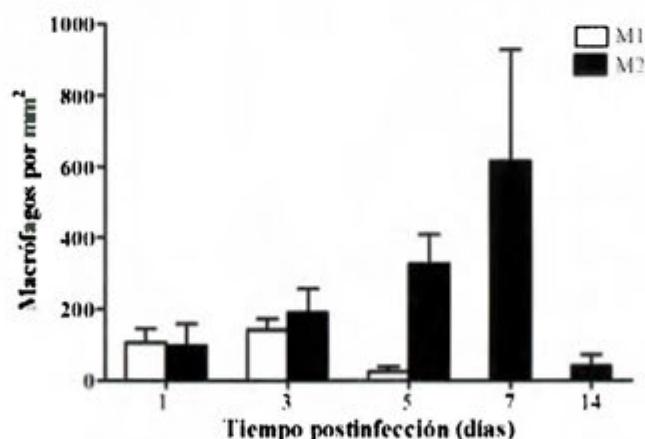
Fig. 9. Reclutamiento de PMNs al sitio de la lesión después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Grupos de 3 ratones CD-1 fueron

inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y se determinó la presencia de PMNs con anticuerpos anti-elastasa mediante inmunofluorescencia en distintos tiempos (A). Para cada tiempo, el número de células correspondientes a PMNs fue determinado (B). La escala de la barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

Al realizar la inmunotinción con anti-iNOS para analizar la población de macrófagos M1, se logró observar señal fluorescente hasta las 24 h después de la infección y de manera aislada en el tejido. A las 24 h se contabilizaron  $106.3 \pm 23.18$  macrófagos M1 por  $\text{mm}^2$  del tejido, y se alcanzó el número máximo a los 3 d postinfección ( $142.60 \pm 18.21$  células por  $\text{mm}^2$ ) (**Figura 10A y 10B**); posteriormente el número declinó a  $25.43 \pm 8.51$  células por  $\text{mm}^2$  a los 5 d (**Figura 10B**). Para detectar macrófagos tipo M2, se utilizaron anticuerpos anti-arginasa, en este caso se observó la señal desde las 24h después de inducir el daño muscular. El aumento de macrófagos M2 en el tiempo fue más evidente que en el caso de los macrófagos M1; para los macrófagos M2, el conteo máximo de células se obtuvo a los 7 días después de la infección ( $616.2 \pm 179.4$  células por  $\text{mm}^2$ ) (**Figura 10A y 10B**), tiempo en el que la mayoría de las células formaba grandes agregados (**Figura 10A**). Pese a que posteriormente el número disminuyó, se lograron detectar incluso a los 14 d ( $41.82 \pm 18.06$  células por  $\text{mm}^2$ ) (**Figura 10B**).



**B**

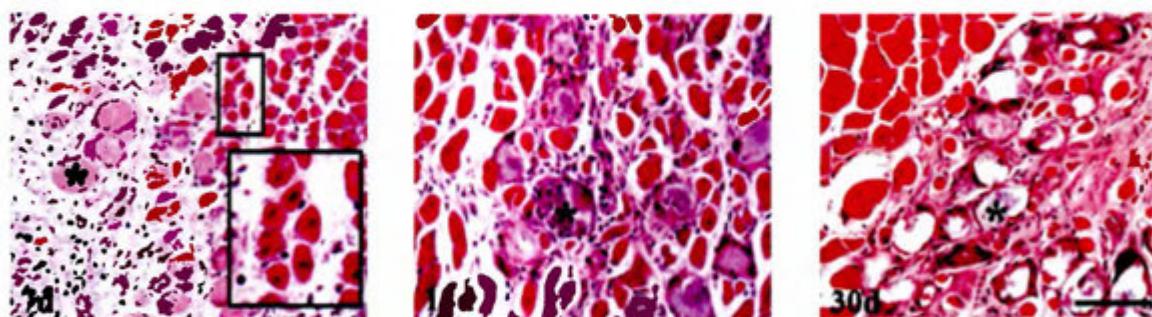


**Fig. 10. Presencia de macrófagos de los fenotipos M1 y M2 en el sitio de la lesión después una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*.** Grupos de 3 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y se determinó la presencia de macrófagos M1 con anticuerpos anti-iNOS y M2 con anticuerpos anti-arginasa, mediante inmunofluorescencia en distintos tiempos. Se muestra la mayor intensidad observada para cada tinción, relacionada con el máximo número de células en el tejido (A). Para cada tiempo, el número de células correspondientes a macrófagos M1 y M2 fue determinado (B). La escala de la barra corresponde a 50  $\mu$ m.

### 3.3. Caracterización del proceso de regeneración muscular después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens*

#### 3.3.1. Descripción histológica del proceso de regeneración muscular después de un reto con un inóculo subletal de *C. perfringens*

Para caracterizar el proceso de regeneración muscular se realizó un análisis histológico de los músculos infectados a partir de los 7 d, tiempo en el que se puede prever una buena o mala regeneración del músculo (Hernández *et al.*, 2011). A los 7 d se observó la presencia de miofibrillas regenerativas caracterizadas por un núcleo central (**Figura 11**), cercanas o impregnadas en una matriz fibrosa. Además, se observaron restos celulares no removidos a pesar de la presencia de infiltrado inflamatorio. Dichas características se mantuvieron en el tiempo, siendo evidentes aun a los 14 y 30 d (**Figura 11**).

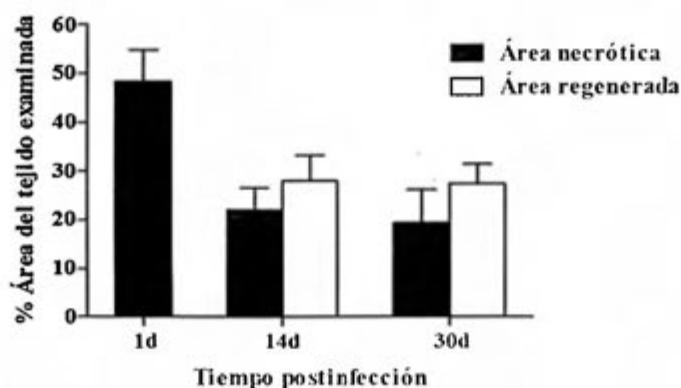


**Fig. 11. Alteraciones en el proceso de regeneración muscular después una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*.** Grupos de 3 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y secciones de 7 d, 14 d y 30 d fueron teñidas con HE. En el recuadro a los 7 d se observan células regenerativas con núcleo central; los asteriscos señalan la presencia de restos celulares impregnadas en una matriz fibrosa, en los diferentes tiempos. La escala de la barra corresponde a 100  $\mu$ m.

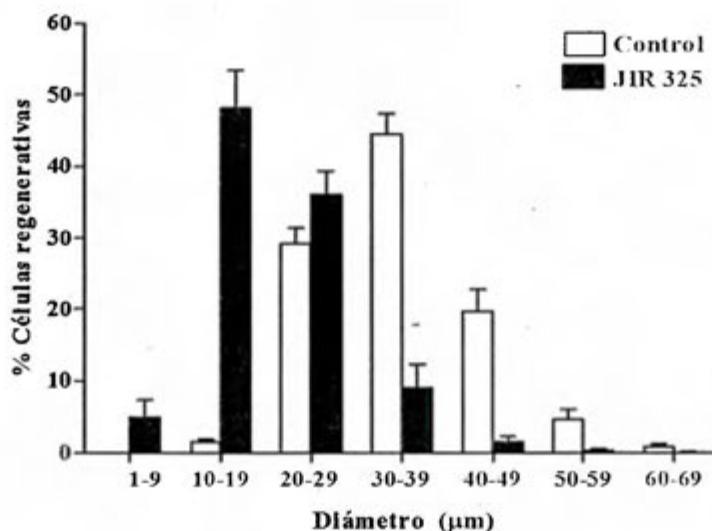
Debido a la presencia tanto de células regenerativas como de restos celulares y áreas fibrosas, se cuantificaron las áreas de regeneración y necrosis a los 14 d y 30 d. A las 24 h, el área de mionecrosis fue de un  $48.33 \pm 6.5\%$  de la totalidad del tejido (lesión inicial); a los 14 d el porcentaje de tejido no regenerado fue de un  $22.12 \pm 4.5\%$ , mientras que un  $27.9 \pm 5.3\%$  del tejido se regeneró. Porcentajes similares se evidenciaron a los 30 d, donde un  $27.5 \pm 4.0\%$

del tejido fue regenerado (Figura 12A). Pese a que idealmente el área regenerada debería aumentar significativamente en el tiempo hasta que se repare el 100% de la lesión inicial, no hubo diferencia significativa entre el porcentaje de área regenerada y el área no regenerada a los 14 y 30 d ( $p < 0.05$ ), evidenciando un proceso de regeneración muscular retardado o deficiente.

A



B



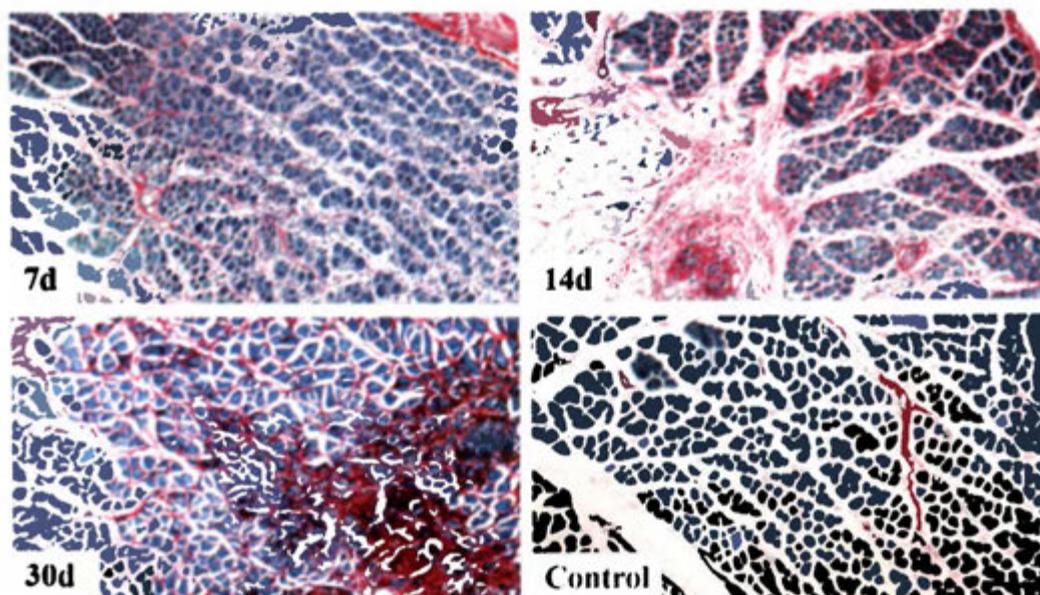
**Fig. 12.** Eficiencia de la regeneración muscular y tamaño de las fibras regenerativas después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Grupos de 3 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y secciones de 1 d, 14 d y 30 d fueron teñidas con HE. (A) La extensión de la mionecrosis

se determinó un día después de la infección como el porcentaje del área examinada correspondiente a fibras necróticas; el porcentaje de área necrótica a los 14 d y 30 d corresponde al tejido con mala regeneración abarcado por detritos celulares y zonas fibrosas, mientras que el porcentaje del área regenerada se determinó a los 14 d y 30 d después de la infección como el área correspondiente a fibras regenerativas. (B) Cuantificación de la distribución de las fibras regenerativas según su diámetro 30 d después de la infección, y comparación con el control inyectado con PBS estéril. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE.

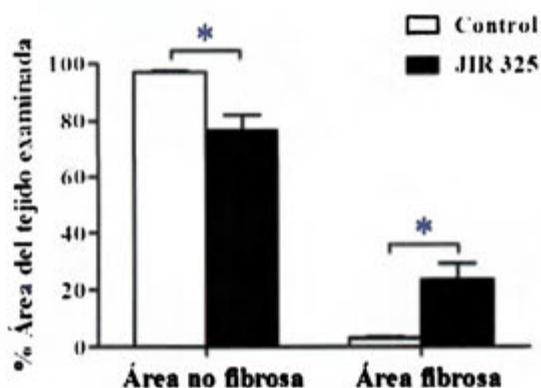
Aunque un porcentaje del tejido dañado se regeneró, al determinar el tamaño de las fibras regenerativas se observó que éste difiere significativamente con el tamaño de las fibras en músculos control a los 30 d. Mientras que en el control un  $44.5 \pm 2.8\%$  de las fibras poseen un diámetro entre 30-39  $\mu\text{m}$ , en los músculos inyectados con *C. perfringens* un  $48.1 \pm 5.4\%$  de las fibras poseen un diámetro entre 10-19  $\mu\text{m}$ . Más aún, en los músculos infectados un  $5.0 \pm 2.4\%$  corresponden a fibras con un diámetro entre 1-9  $\mu\text{m}$ , a diferencia de los músculos control, que no presentan fibras en este rango y llegan a alcanzar diámetros de más de 60  $\mu\text{m}$  (**Figura 12B**).

Otra característica de una mala regeneración es el remplazo de las fibras musculares por tejido fibroso, por lo que se realizó una tinción específica para teñir fibras de colágeno con Rojo sirio. Áreas rojas indicadoras de deposición de colágeno fueron evidentes desde los 7 d alrededor de pequeñas células regenerativas, éstas se mantuvieron en el tiempo y con mayor intensidad a los 14 d y 30 d (**Figura 13A**). Al realizar el análisis a los 30 d, el control mostró solamente un  $3.1 \pm 0.5\%$  de fibras de colágeno en el área total, mientras que en los músculos infectados con una dosis subletal de *C. perfringens*, un  $23.5 \pm 5.6\%$  del área del tejido correspondía a deposición de colágeno, lo cual representa una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ) (**Figura 13B**), y mantiene relación con el área no regenerada determinada previamente.

A

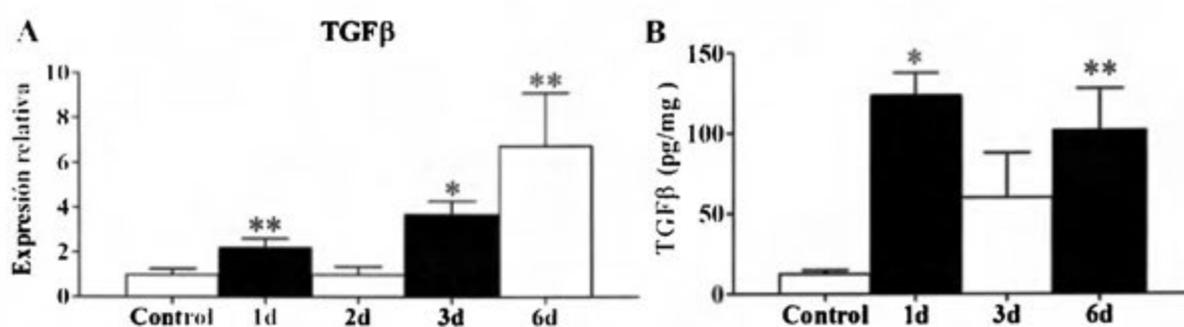


B



**Fig. 13. Tinción de colágeno en gastrocnemius después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*.** Grupos de 3 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens*. (A) Secciones de 7 d, 14 d y 30 d teñidas con Rojo Sirio; las áreas rojas corresponden a fibras de colágeno, mientras que las verdes a las demás proteínas. El control fue inyectado con PBS estéril. La escala de la barra corresponde a 100  $\mu$ m. (B) El tejido fibrótico se determinó a los 30 d como el porcentaje del área examinada correspondiente a colágeno. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ , para muestras que difieren estadísticamente del control.

Debido a que el TGF $\beta$  es un factor que se ha asociado a la fibrosis en el proceso de regeneración muscular, se analizó su expresión génica y proteica posterior a una infección con una dosis subletal de *C. perfringens*. Tanto a nivel génico como proteico, se observó que este factor presenta un comportamiento bimodal; cuando se analizó la expresión relativa del ARNm, se observó un aumento significativo un día después de la infección ( $p < 0.05$ ) con relación al control, su expresión disminuyó a los 2 d pero aumentó nuevamente a los 3 d ( $p < 0.01$ ) y se mantuvo elevado al menos hasta los 6 d ( $p < 0.05$ ) (**Figura 14A**).



**Fig. 14.** Expresión de TGF $\beta$  en homogenizados de gastrocnemius de animales después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*. Grupos de 4-6 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $6 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens* y se determinó la expresión de TGF $\beta$ 1 en los músculos infectados mediante PCR-RT (A) y ELISAs (B), en distintos tiempos. El control fue inyectado con PBS estéril. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.05$ , para muestras que difieren estadísticamente del control.

Similar a lo observado en los experimentos de PCR-RT, se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de TGF $\beta$  respecto al control un día después de la infección ( $p < 0.01$ ), y pese a que hubo una disminución a los 3 d, a los 6 d la concentración de la proteína continuó siendo significativamente mayor al control ( $p < 0.05$ ) (**Figura 14B**).

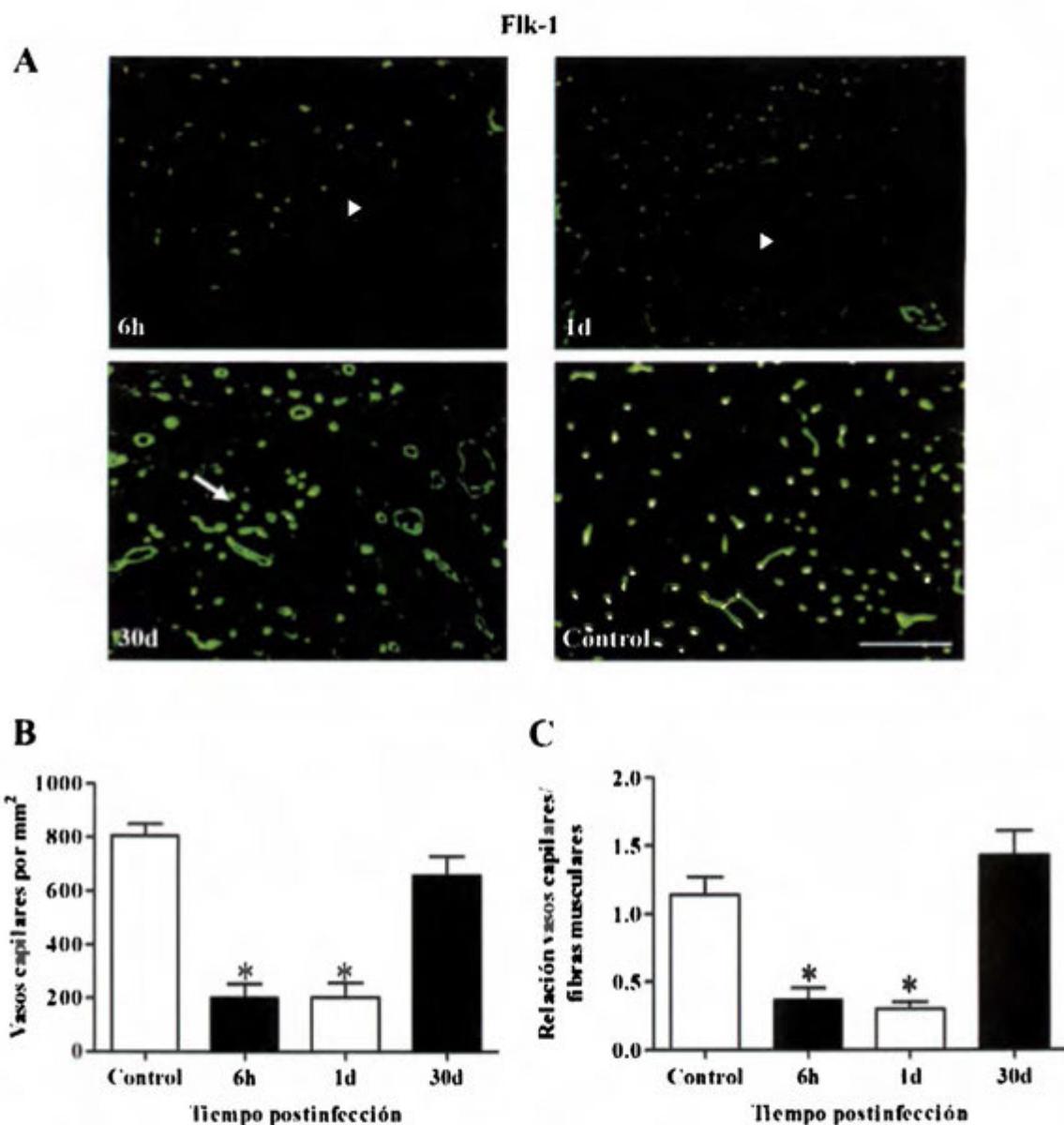
### 3.3.2. Alteraciones en la densidad muscular de vasos capilares y nervios después de un reto con un inóculo subletal de *C. perfringens*

Para determinar si *C. perfringens* es capaz de dañar el endotelio que forma parte del tejido muscular, se realizó una inmunotinción con anticuerpos específicos para el receptor

del factor de crecimiento endotelial Flk-1. A las 6 h posterior al reto, fue evidente una disminución en el número de los vasos capilares, con resultados similares a las 24 h (**Figura 15A**). La carencia de vasos capilares se observó principalmente en zonas de mionecrosis; además, las estructuras que mostraron una señal positiva para la tinción en estas zonas, eran de menor tamaño a las del control, por lo que probablemente eran vasos capilares no funcionales o restos de células endoteliales (**Figura 15A**).

Cuando se cuantificaron los vasos capilares por área, el control mostró un promedio de  $805.3 \pm 43.8$  capilares por  $\text{mm}^2$ , mientras que en los músculos afectados por *C. perfringens* el número efectivamente disminuyó de forma significativa a  $201.3 \pm 51.5$  capilares por  $\text{mm}^2$  a las 6 h ( $p < 0.05$ ) y  $203 \pm 52.9$  capilares por  $\text{mm}^2$  a las 24 h postinfección ( $p < 0.05$ ) (**Figura 15B**). Resultados similares se obtuvieron al reportar el número de vasos capilares por fibra muscular, ya que mientras que el control mostró una media de  $1.14 \pm 0.13$  capilares por fibra muscular, en los músculos infectados la media disminuyó significativamente a  $0.37 \pm 0.09$  a las 6 h ( $p < 0.05$ ) y a  $0.30 \pm 0.05$  a las 24 h ( $p < 0.05$ ) (**Figura 15C**).

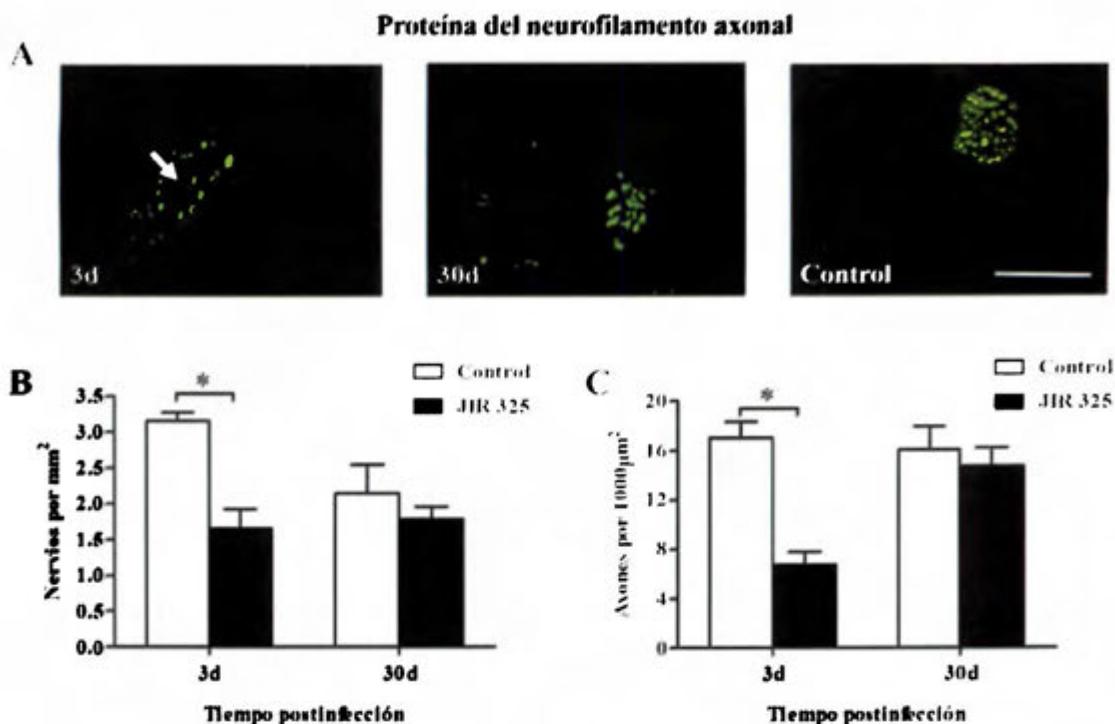
Pese a la significativa disminución de la densidad de vasos capilares en tiempos tempranos después de la infección, a los 30 d no se encontraron diferencias significativas en el número de capilares por área o por fibra muscular respecto al control (**Figura 15B y C**), y los mismos fueron evidentes incluso en tejido fibroso (**Figura 15A**).



**Fig. 15. Número de vasos capilares en gastrocnemius después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*.** Grupos de 3 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens*. Secciones histológicas de 6 h, 1 d y 30 d fueron teñidas con anticuerpos anti-Flk-1 mediante inmunofluorescencia. La punta de flecha señala secciones de 6 h y 1 d posterior a la infección que carecen de vasos capilares; la flecha señala la presencia de vasos capilares en áreas fibrosas a los 30 d (A). La escala de la barra corresponde a 100  $\mu$ m. Se determinó el número de capilares por área (B) y por fibra muscular (C) en diferentes tiempos posterior a la infección. El control fue inyectado

con PBS estéril. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ , para muestras que difieren estadísticamente del control.

Respecto a la alteración de los nervios en el músculo, se utilizó un anticuerpo contra el neurofilamento de los axones que permitiera su detección mediante inmunofluorescencia. De esta manera, fue posible observar una disminución en el número de nervios a los 3 d después de la infección con *C. perfringens* ( $1.66 \pm 0.27$  nervios por  $\text{mm}^2$ ), cuando se comparó con el control ( $3.16 \pm 0.11$  nervios por  $\text{mm}^2$ ) ( $p < 0.05$ ) (**Figura 16B**). Además se observó una alteración en el número de axones dentro de los nervios (**Figura 16A**), de modo que mientras que en control el promedio fue de  $17.03 \pm 1.28$  axones por  $1000 \mu\text{m}^2$ , en los músculos afectados disminuyó significativamente a  $6.72 \pm 1.07$  axones por  $1000 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0.05$ ) (**Figura 16C**). A pesar del daño observado a los 3 d postinfección, cuando se analizaron las muestras transcurridos 30 d, no se encontraron diferencias significativas respecto al control para los puntos analizados (**Figura 16**).



**Fig. 16. Inervación en gastrocnemius después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens*.** Grupos de 3 ratones CD-1 fueron inyectados intramuscularmente con  $1 \times 10^6$  UFC de *C. perfringens*. Secciones 3 d y 30 d fueron teñidas con anticuerpos anti-proteína del neurofilamento pesado mediante inmunofluorescencia. La flecha señala alteraciones en secciones histológicas a los 3 d posterior a la infección (A). La escala de la barra corresponde a  $100 \mu\text{m}$ . Se determinó el número de nervios por área (B) y los axones dentro de cada nervio (C) en diferentes tiempos posterior a la infección. El control fue inyectado con PBS estéril. Los resultados representan las medias  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ , para muestras que difieren estadísticamente del control.

## DISCUSIÓN

### 4.1. Daño muscular inducido por un inóculo subletal de *C. perfringens*

Al retar animales con un inóculo subletal de *C. perfringens*, al igual que con un inóculo letal para inducir un cuadro de gangrena gaseosa, se observa mionecrosis caracterizada por el aumento significativo en los niveles de CK en plasma a las 5 h postinfección. No obstante, al usar un inóculo subletal la destrucción del tejido logró ser detenida por el sistema inmune antes de que transcurrieran las 24 h de infección, momento en el que los niveles de CK disminuyeron casi al nivel del control (**Figura 5**). Una de las características de la gangrena gaseosa es la ausencia de infiltrado inflamatorio al sitio de lesión debido a la sobreexpresión de moléculas de adhesión que hacen que los PMNs permanezcan adheridos al endotelio y no puedan extravasarse al tejido; sin embargo, en una infección generada con un inóculo subletal de *C. perfringens*, no hay inhibición de la quimiotaxis de células inflamatorias al sitio de infección (O'Brien *et al.*, 2007). A pesar de que la infección por *C. perfringens* es controlada antes de transcurridas 24 h y de la presencia de infiltrado inflamatorio, la bacteria logra persistir en el tejido. Previamente O'Brien y Melville (2004), encontraron viable un 5% de un inóculo subletal de *C. perfringens* en el tejido muscular de ratones 24 h después de la infección; inclusive, pudieron detectar células a las 72 h postinfección. En el presente estudio, de manera similar se recuperó un 3% de un inóculo subletal 24 h después de la infección, pero lo más sorprendente fue evidenciar la presencia de células viables incluso a los 5 d y 9 d después de inyectar el inóculo (**Figura 6**). La persistencia de la bacteria por periodos significativos es de mucha importancia a nivel clínico, más aún cuando algunos casos de gangrena se desarrollan días después del trauma o la cirugía (O'Brien y Melville, 2004).

Por otra parte, se sabe que la PFO es el mediador primario de la citotoxicidad de *C. perfringens* hacia los macrófagos; mientras que a dosis letales sólo la PLC es necesaria para el desarrollo de la mionecrosis, a inóculos subletales tanto la PLC como la PFO son necesarias para la sobrevivencia de *C. perfringens* en el músculo de ratones (O'Brien y

Melville, 2004). *C. perfringens* puede sobrevivir en presencia de macrófagos, es citotóxica para los mismos y puede escapar del fagosoma; de esta manera el patógeno puede lograr sobrevivir en el tejido del hospedero cuando las células bacterianas son pocas en relación con las fagocíticas, como al inicio de una infección (O'Brien y Melville, 2004).

Se sugiere que la bacteria puede permanecer en el tejido del paciente y que cuando las condiciones de hipoxia por mala irrigación son óptimas, por ejemplo en pacientes diabéticos, la bacteria es capaz de proliferar y establecer el cuadro de gangrena.

#### **4.2. Respuesta inflamatoria aguda después de un reto intramuscular con un inóculo subletal de *C. perfringens***

Después de una lesión muscular, los macrófagos residentes del tejido promueven un temprano y marcado influjo de PMNs a través de quimioatrayentes (Tidball, 2017). Debido a lo anterior y a la presencia de infiltrado inflamatorio en el tejido, se analizó la expresión de KC, MIP2 y MCP1. En los tres casos, la expresión de las quimiocinas fue significativamente mayor a la del control (**Figura 8**), en correlación con la quimiotaxis tanto de PMNs como de monocitos/macrófagos, al sitio de infección.

Después de una lesión muscular se reporta que los PMNs alcanzan su máximo número aproximadamente a las 24h y luego declinan rápidamente (Tidball, 2017). Cuando se determinó la presencia de PMNs en el tejido de animales sometidos a la infección con un inóculo subletal de *C. perfringens*, estos fueron observados desde las primeras horas y alcanzaron su máximo número 24 h después de la infección; posteriormente, a pesar de que el número disminuyó, se mantuvieron en el tejido hasta por al menos 5 d (**Figura 9**). Además, aunque los PMNs juegan un rol importante en la eliminación de bacterias y de detritos celulares mediante fagocitosis (Amulic *et al.*, 2012), la bacteria persistió en el músculo aun en tiempos tardíos y la remoción de detritos en la fase aguda fue escasa. Una posible explicación a lo anterior podría ser la alteración de la función de los PMNs por efecto de las toxinas de *C. perfringens*, dado que la PFO induce citotoxicidad en los PMNs (Stevens *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 1997), y además, *C. perfringens* interfiere en la reposición de PMNs

maduros en la circulación periférica, inhibiendo su maduración de una manera dependiente de la CpPLC (Takehara *et al.*, 2016). Adicionalmente, el daño vascular ocasionado por la infección con *C. perfringens* impide el flujo de células inflamatorias, tal y como se discutirá posteriormente.

Una de las funciones de los PMNs es la secreción de citoquinas proinflamatorias (Tidball, 2008). Tanto la PFO como la CpPLC, son absorbidas sistémicamente, interactúan con macrófagos, plaquetas y células endoteliales para atenuar su función, mientras que inducen la producción de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL1 e IL6, las cuales contribuyen al fallo multiorgánico (Stevens *et al.*, 2012). Cuando se inyectó un inóculo subletal de *C. perfringens* en el gastrocnemius de ratones, efectivamente hubo un aumento significativo de IL1, IL6 y TNF $\alpha$  desde las 6 h hasta al menos 48 h postinfección (**Figura 7**).

Adicionalmente, no se detectó un aumento significativo en la síntesis de IFN $\gamma$  a nivel proteico; el TNF $\alpha$  y el IFN $\gamma$  son las principales citoquinas que llevan a cabo la activación clásica de los macrófagos a un fenotipo M1 proinflamatorio (Tidball y Villalta, 2010; Tidball, 2017). La ausencia del IFN $\gamma$ , podría ser la responsable de la baja afluencia de la población de macrófagos M1. En un proceso infeccioso se espera que 24 h después de una lesión muscular, la expresión de IFN $\gamma$  aumente y sus niveles se mantengan elevados hasta por 5 d. El IFN $\gamma$  estimula a que los macrófagos cambien al fenotipo M1 para la remoción de fagocitos y para la secreción autocrina de IFN $\gamma$ , el cual refuerza el fenotipo M1 (Cheng *et al.*, 2008; Tidball *et al.*, 2017). En estudios experimentales en los que se ha bloqueado la señalización del IFN $\gamma$ , se observa en macrófagos una reducción en la expresión de transcritos que indican la activación del fenotipo M1, como la iNOS (Cheng *et al.*, 2008). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, debido a que además de la carencia de actividad fagocítica, se evidencia poca afluencia de macrófagos M1 detectada por medio de iNOS (**Figura 10**), lo que sugiere alteraciones en esta población de células inflamatorias ante la infección con un inóculo subletal de *C. perfringens*.

Las IL10, IL4 e IL13 poseen papeles definidos en la activación de los macrófagos del fenotipo M2, los cuales constituyen una población compleja que se divide en subpoblaciones con especializaciones funcionales y moleculares (Mantovani *et al.*, 2004; Tidball y Villalta, 2010). Los macrófagos M2a son activados por IL4 e IL13, secretan IL10, expresan arginasa 1, promueven la cicatrización de heridas y la regeneración del tejido, mientras que los M2b son activados por complejos inmunes o receptores tipo Toll y liberan citoquinas anti-inflamatorias asociadas a la respuesta Th2 (Tidball y Villalta, 2010; Rigamonti, 2013). Por su parte, los macrófagos del fenotipo M2c son activados por la IL10, liberan citoquinas que desactivan el fenotipo M1, pueden promover la proliferación de células no mieloides e influir en la deposición de la matriz extracelular (Tidball y Villalta, 2010; Tidball, 2017). Después del reto con un inóculo subletal de *C. perfringens*, se observa un aumento significativo en el nivel de IL10 en el tejido desde las 6 h hasta los 6 d después de la infección a nivel de expresión génica, y a los 2 d a nivel proteico (**Figura 7**). Aunque no se detectó un cambio significativo en cuanto la expresión de IL4, para la IL13 se observó un aumento a nivel de expresión génica a los 6 d. Adicionalmente, se estudió la población de macrófagos utilizando anticuerpos contra la arginasa y se observó señal desde el primer día, aumentando en el tiempo hasta los 7 d y manteniéndose incluso a los 14 d (**Figura 10**). De modo que probablemente se encuentren interactuando distintas subpoblaciones de macrófagos M2, con repercusiones positivas y negativas en la reparación del daño tisular generado por un inóculo subletal de *C. perfringens*.

Cuando se compara el panorama observado respecto a la llegada y permanencia de las distintas células inflamatorias, se observa una prolongación de la respuesta inflamatoria dada la presencia de los PMNs hasta por 5 d en el tejido, lo cual correlaciona con una alta expresión de citoquinas proinflamatorias hasta por al menos 2 d. Además, los macrófagos M1 aunque en número reducido, también permanecieron en el tejido por más tiempo del esperado; se propone que la ausencia en la expresión proteica de IFN $\gamma$  en la fase aguda de la infección, tuvo un efecto directo en el número reducido de macrófagos M1 y en su actividad. Adicionalmente, se logra evidenciar la llegada de macrófagos M2, cuyo número aumenta en

tiempo, ligados a la expresión de arginasa y de la citoquina anti-inflamatoria IL10 (Figura 17).

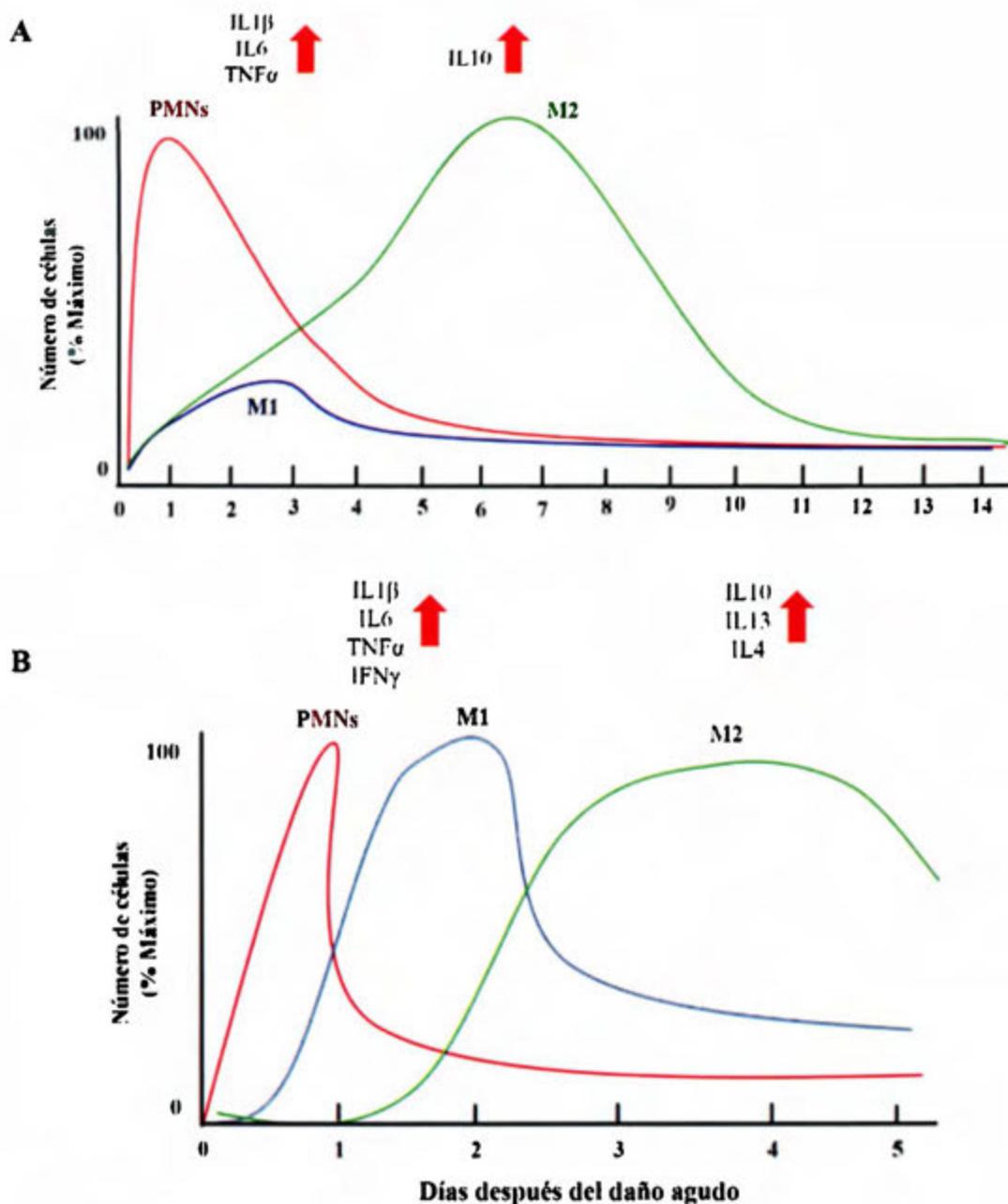


Fig. 17. Comparación del tiempo de llegada de células inflamatorias después de una infección experimental con un inóculo subletal de *C. perfringens* con los tiempos de llegada de células inflamatorias reportados en la literatura. (A) Tiempos de llegada según

el panorama observado en este estudio. (B) Tiempos de llegada esperados ante una lesión muscular, según la literatura (Tidball, 2008; Tidball, 2011).

#### **4.3. Proceso de regeneración muscular después de un reto con un inóculo subletal de *C. perfringens***

Posterior a una lesión muscular, el proceso de regeneración es mediado por un tipo específico de células madre, las SCs, pero además, involucra la interacción de estas células miogénicas con otras células residentes, células inflamatorias, vasos sanguíneos, nervios y la matriz extracelular (Ciciliot y Schiaffino, 2010; Hernández *et al.*, 2011). Relacionado con lo anterior, estudios previos permiten concluir que son tres los requisitos básicos para que ocurra el proceso de regeneración muscular: a) un flujo sanguíneo adecuado en el músculo en regeneración; b) inervación en las células regenerativas; y c) permanencia de la lámina basal alrededor de las fibras musculares necróticas, que sirve de andamio y sustrato para la regeneración (Gutiérrez, 1989).

La importancia del flujo sanguíneo radica por una parte, en la afluencia del infiltrado inflamatorio al sitio de la lesión. Cuando se analizó la densidad vascular posterior a una infección con un inóculo subletal de *C. perfringens*, se determinó que la microvasculatura se ve afectada en las primeras horas después de la infección, tiempo que coincide con la llegada de las primeras células inflamatorias. Aunque se evidencia la presencia de infiltrado inflamatorio, el daño vascular y el efecto directo de la CpPLC y la PFO sobre células del sistema inmune, puede afectar la migración y función de las células inflamatorias hacia la zona del daño, lo que resulta en la deficiente remoción de detritos. Se ha reportado que perturbaciones que afectan la remoción de células muertas y otros restos asociados, retrasan el proceso de regeneración muscular (Tidball, 2017; Zhao *et al.*, 2016), al convertirse los restos celulares en un obstáculo físico para la regeneración del músculo. Además la fagocitosis de PMNs apoptóticos o necróticos, suprime la expresión de TNF $\alpha$  y aumenta la

expresión de TGF $\beta$ , moléculas con papeles importantes en el proceso regenerativo (Tidball, 2017).

En otros casos de mionecrosis, como en los inducidos por venenos de serpiente, se ha determinado que en el proceso regenerativo después de la inyección de una miotoxina I de *Bothrops asper*, los PMNs juegan un rol prominente en el proceso de regeneración muscular relacionado con la fagocitosis del tejido necrótico y el reclutamiento de otras células inflamatorias, dos eventos asociados con una respuesta regenerativa exitosa; reiterando de esta manera, la importancia de la llegada y función de este tipo de células en la zona dañada (Texeira *et al.*, 2003).

Otra consecuencia del daño al sistema vascular en el proceso regenerativo, es la limitación en la distribución de oxígeno. La disminución del oxígeno en el tejido debido al daño vascular, puede ser otra de las razones por las que *C. perfringens* logra persistir aun en tiempos tardíos; inclusive, en daños más severos la hipoxia puede promover la proliferación de la bacteria y el consecuente desarrollo de gangrena gaseosa. Por otra parte, además de la limitación de oxígeno, con el daño al endotelio se altera la distribución de moléculas y nutrientes necesarios para el proceso regenerativo.

En estudios realizados con toxinas y venenos de serpientes, se ha determinado que como consecuencia a la alteración de la microvasculatura, se afecta el proceso regenerativo con sustitución del tejido muscular por fibrosis en algunas áreas, y el diámetro de las fibras regenerativas se reduce (Gutiérrez *et al.*, 1984; Arce *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 2011). De esta manera, aunque la densidad capilar se restaure a los 30 d, es posible que el daño generado por *C. perfringens* a nivel de vasos sanguíneos en las primeras horas después de la infección (**Figura 15**), sea una de las principales causas que alteran el proceso regenerativo, como lo evidencia la presencia de fibras regenerativas con diámetro pequeño, áreas de fibrosis y detritos celulares, a los 30 d después de la infección.

La inervación es otro de los requisitos para que el proceso de regeneración muscular se lleve a cabo exitosamente. La proliferación y fusión de las células miogénicas puede

ocurrir de manera similar en músculos que se regeneran en ausencia de nervios y en aquellos en los que los nervios están intactos (Slater y Schiaffino, 2008); sin embargo, aunque los eventos iniciales del proceso de regeneración muscular se pueden dar en ausencia de inervación, esta última sí se requiere para el crecimiento y recuperación de la función del nervio (Kalhovde *et al.*, 2005; Slater y Schiaffino, 2008). En el modelo en estudio, aunque la densidad y estructura de los nervios se afectó con un inóculo subletal de *C. perfringens* a los 3 d después de la infección, la inervación se recuperó y a los 30 d se observó similar a la del control (**Figura 16**). De esta manera, la inervación no parece ser una causa de la mala regeneración después del daño muscular generado por *C. perfringens*; no obstante, se debería elucidar si alguna de las toxinas presentes en las cepas de *C. perfringens* que generan gangrena gaseosa, está involucrada en algún daño a nivel de la unión y/o transmisión neuromuscular, como pasa en el caso de la toxina letal de *Clostridium sordelii* (Barbier *et al.*, 2004).

Para que la regeneración muscular sea un proceso exitoso, se requiere de un andamio que permita mantener la posición de las fibras musculares. En ocasiones, la presencia de células inflamatorias después de una lesión es prolongada y la membrana basal de las fibras musculares es fagocitada antes de lo necesario (Serrano y Muñoz-Cánoves, 2010). El proceso de deposición de matriz después de un proceso mionecrótico, aunque en un inicio es beneficiosa, se convierte en patogénica si continúa de manera descontrolada, resultando en la acumulación permanente de colágeno alrededor de las miofibras, inclusive, puede conducir a la sustitución del músculo esquelético por tejido fibroso (Serrano y Muñoz-Cánoves, 2010). Los fibroblastos contribuyen a la formación del tejido fibroso mediante la producción y acumulación de componentes de la matriz extracelular, como ácido hialurónico, fibronectina, proteoglicanos y colágenos intersticiales (Serrano y Muñoz-Cánoves, 2010).

Cuando se analizaron las secciones histológicas de animales infectados con un inóculo subletal de *C. perfringens*, se observó que a los 30 d, casi un 25% del tejido correspondía a colágeno acumulado en zonas donde el proceso regenerativo fue deficiente (**Figura 13**). Lo anterior puede estar asociado a la sobreexpresión de quimiocinas, dado que

algunos tipos de células inflamatorias tempranas, incluyendo los macrófagos y PMNs, producen citoquinas y quimiocinas que son mitogénicas y quimiotácticas para células endoteliales y que además, están involucradas en el mecanismo de fibrogénesis. Entre las anteriores, se ha reportado que la MCP1, es un mediador profibrótico cuya neutralización reduce el desarrollo de fibrosis (Smith *et al.*, 1995; Wynn, 2008).

Modelos experimentales de fibrosis han documentado potentes propiedades antifibróticas para las citoquinas asociadas a la respuesta Th1 como el IFN $\gamma$  (Wynn, 2008), por lo que su ausencia en el modelo en estudio podría estar asociada con la sobreproducción de matriz extracelular. Por su parte, la IL10 activa una subpoblación de macrófagos M2 que promueve la deposición de la matriz extracelular y la fibrosis en distintas condiciones patogénicas, relacionada con el aumento de la misma IL10 y el TGF $\beta$  (Serrano y Muñoz-Cánoves, 2010; Tidball, 2017).

El TGF $\beta$  es el regulador de la matriz extracelular estudiado más extensamente y se ha asociado al desarrollo de fibrosis en un número de enfermedades al ser uno de los principales activadores de macrófagos y fibroblastos; de los tres isotipos de TGF $\beta$  en mamíferos, la fibrosis en tejido es atribuida principalmente a la isoforma TGF $\beta$ 1 (Letterio y Roberts, 1998; Wynn, 2008). En este trabajo se evidenció un aumento del TGF $\beta$ 1 tanto en tiempos tempranos como en tiempos tardíos (**Figura 14**), donde puede estar relacionado con la acumulación de colágeno evidenciada desde los 7 d.

Adicionalmente, es importante considerar que la respuesta inflamatoria durante las etapas tempranas de la regeneración muscular está acoplada temporal y espacialmente a las etapas iniciales de la miogénesis, cuando las SCs son activadas e inician su proliferación y diferenciación (Tidball, 2017). Además de la modulación de la respuesta inflamatoria, otra función relevante del IFN $\gamma$  es a nivel del proceso de regeneración muscular, en el que el IFN $\gamma$  regula directamente las células miogénicas en su proceso de diferenciación (Cheng *et al.*, 2008; Tidball *et al.*, 2017), de modo que alteraciones a nivel de fibras regenerativas observadas en este estudio pueden ser también una consecuencia de la ausencia de IFN $\gamma$ .

De manera general, ante la infección con un inóculo subletal de *C. perfringens*, se estimula la expresión de quimioatrayentes y citoquinas que estimulan la llegada de distintas células inflamatorias al sitio de la lesión. No obstante, previamente se ha reportado que la bacteria genera toxinas capaces de afectar directamente a los PMNs y macrófagos y como consecuencia, alterar su función. Adicionalmente, estas células inflamatorias se pueden ver afectadas por la ausencia de factores estimuladores como lo es el IFN $\gamma$  para los macrófagos proinflamatorios. Por su parte, la bacteria genera daño a nivel de la microvasculatura y como consecuencia, afecta la migración de los fagocitos en el tejido dañado; como consecuencia, se altera el flujo y función de las distintas células inflamatorias, por lo que la remoción de detritos celulares es deficiente. Lo anterior, aunado a la liberación de factores que estimulan la sobreproducción de colágeno como el TGF $\beta$ , dan como resultado una mala regeneración muscular, caracterizada por áreas necróticas, fibrosis y fibras regenerativas pequeñas.

Aunque los hallazgos expuestos son de relevancia en la comprensión de la mionecrosis generada por *C. perfringens*, una de las principales limitaciones del estudio con un modelo experimental murino, es la generación de la lesión inicial con un inóculo grande de bacterias. Lo anterior debido a que en situaciones cotidianas la infección suele iniciar por un trauma y la subsecuente invasión de esporas o formas vegetativas de *C. perfringens* en número limitado (Stevens *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). En pacientes diabéticos o con problemas de irrigación, como factores predisponentes para que se establezca la infección, es difícil determinar todos los requerimientos de la bacteria para que la infección se establezca exitosamente y en forma rápida. Sería muy valioso tener un modelo experimental de gangrena gaseosa que se pueda reproducir de igual manera en la que se produce la enfermedad en condiciones normales.

## CONCLUSIONES

Se demostró que una infección en un modelo murino, con un inóculo subletal de *C. perfringens* genera una mionecrosis moderada, evidenciada por el aumento en los niveles de CK en plasma. La infección es controlada por el sistema inmune durante las primeras 24 h posteriores al reto, aunque la bacteria persiste en el tejido infectado hasta por al menos 9 d.

La respuesta inflamatoria generada al retar con un inóculo subletal de *C. perfringens* induce un aumento significativo en la expresión génica y proteica de las citoquinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ , no se detectó un aumento de IFN $\gamma$ , y de las citoquinas anti-inflamatorias IL4, IL13 e IL10, sólo la IL10 aumentó significativamente. Además, fue evidente un aumento significativo en la expresión génica de moléculas quimioatrayentes tanto de PMNs (MIP2 y KC), como de macrófagos (MCP1), lo que correlaciona con la presencia de infiltrado inflamatorio.

El IFN $\gamma$  es una citoquina que estimula de la llegada y activación de macrófagos M1, su ausencia se asocia a la no remoción de detritos celulares y a la mala regeneración muscular. Además la deficiencia de IFN $\gamma$  correlaciona con la alteración en la permanencia de otras células inflamatorias como los PMNs, los cuales se detectaron en el tejido infectado hasta por 5 d después de un reto con un inóculo subletal de *C. perfringens*. En la infección experimental se detectó la presencia escasa de macrófagos M1 y un mayor influjo de macrófagos M2, los cuales alcanzaron su mayor densidad a los 3 y 7 d, respectivamente.

La infección generada con un inóculo subletal de *C. perfringens* altera el proceso de regeneración muscular. A los 30 d se evidenció la presencia de células regenerativas con un diámetro menor al del control, restos celulares no removidos y una matriz fibrosa debido a la deposición de colágeno, esta última relacionada con el aumento en la expresión de TGF $\beta$ 1.

Se observó una disminución en el número de nervios y en el número de axones dentro de los mismos, 3 d después de la infección con *C. perfringens*; sin embargo, los mismos se

restauraron transcurridos 30 d y el daño a la inervación no parece estar ligado a la deficiencia en el proceso de regeneración muscular.

En resumen, se observó una mala regeneración inducida por un reto con un inóculo subletal de *C. perfringens* dada principalmente por el daño vascular generado y la alteración de la respuesta inflamatoria. La ausencia de INF $\gamma$  es posiblemente la responsable de la no remoción del material necrótico y los detritos en el tejido infectado, lo que causa una respuesta inflamatoria alterada y afecta severamente la regeneración muscular.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Debido a la relevancia de las CSs en el proceso de regeneración muscular, el efecto de la infección con un inóculo subletal de *C. perfringens* en la activación, proliferación y diferenciación de dichas células, así como la expresión de los marcadores miogénicos de diferenciación, son parte de las interrogantes que quedan por esclarecer.

Dado que el tratamiento de la gangrena gaseosa generada por *C. perfringens* es muy limitado y las secuelas observadas en los pacientes que la sufren son severas, como la amputación, se debe evaluar el uso de antioxidantes (resultados previos) y anticuerpos contra la CpPLC (resultados no publicados), en la modulación de la respuesta inflamatoria y en el del proceso de regeneración muscular después de una gangrena gaseosa.

Queda pendiente elucidar si la manipulación de la respuesta inflamatoria a través del IFN $\gamma$ , se puede contemplar como una estrategia terapéutica que mejore la eficiencia del proceso de regeneración muscular después de un daño muscular generado por *C. perfringens*.

## REFERENCIAS

- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Guillouard, I., Titball, R.W., Naylor, C.E., Rucavado, A., Lomonte, B., Basak, A.K., Gutiérrez, J.M., Cole, S., Thelestam, M. (2000). Identification of residues critical for toxicity in *Clostridium perfringens* phospholipase C, the key toxin in gas gangrene. *Eur. J. Biochem.* 267(16):5191–5197.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30:459–489.
- Arce, V., Brenes, F., Gutiérrez, J.M. (1991). Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *Int. J. Exp. Pathol.* 72(2): 211–226.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R., Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204(5):1057-1069.
- Awad, M.M., Bryant, A.E., Stevens, D.L., Rood, J.I. (1995). Virulence studies on chromosomal  $\alpha$ -toxin and  $\Theta$ -toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of  $\alpha$ -toxin in *Clostridium perfringens* mediated gas gangrene. *Mol. Microbiol.* 15(2):191-202.
- Barbara, G., De Giorgio, R., Deng, Y., Vallance, B., Blennerhassett, P., Collins, S. (2001). Role of immunologic factors and cyclooxygenase 2 in persistent postinfective enteric muscle dysfunction in mice. *Gastroenterology.* 120(7):1729-1736.
- Barbier, J., Popoff, M., Molgó, J. (2004). Degeneration and regeneration of murine skeletal neuromuscular junctions after intramuscular injection with a sublethal dose of *Clostridium sordellii* lethal toxin. *Infect. Immun.* 72(6):3120-3128.

Bryant, A.E., Bergstrom, R., Zimmerman, G.A., Salyer, J.L., Hill, H.R., Tweten, R.K., Sato, H., Stevens, D. L. (1993). *Clostridium perfringens* invasiveness is enhanced by effects of theta toxin upon PMNL structure and function: the roles of leukocytotoxicity and expression of CD11/CD18 adherence glycoprotein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 7(4):321-36.

Bryant, A.E., Stevens, D.L. (1996). Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* 64(1):358–62.

Bryant, A.E., Chen, R., Nagata, Y., Wang, Y., Lee, C., Finegold, S., Guth, P., Stevens, D.L. (2000). Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIb/IIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in *Clostridium perfringens* gas gangrene. *The J. Infec. Dis.* 182(3):808-815.

Bryant, A.E., Stevens, D.L. (2010). Clostridial myonecrosis: new insights in pathogenesis and management. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12:383-391.

Bryant, A.E., Stevens, D.L. (2015). Clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. 4<sup>a</sup> Ed. Elsevier. 977-994.

Brynstad, S., Sarker, M., McClane, B., Granum, P., Rood, J. (2001). Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* 69(15):3483-3487.

Bunting, M., Lorant, D.E., Bryant, A.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Stevens, D.L., Prescott, S.M. (1997). Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 100(3):565-574.

Carosio, S., Berardinelli, M., Aucello, M., Musaró, A. (2011). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res. Rev.* 10(1):35-42.

Chargé, S., Rudnicki, M. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84(1):209-238.

Cheng, M., Nguyen, M., Fantuzzi, G., Koh, T. (2008). Endogenous interferon- $\gamma$  is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 294(5):C1183-C1191.

Ciciliot, S., Shiaffino, S. (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Curr. Pharm. Des.* 16(8):906-914.

De Filippo, K., Henderson, R., Laschinger, M., Hogg, N. (2008). Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J. Immunol.* 180(6):4308-4315.

Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29(6):313-326.

Eaton J.T., Naylor C.E., Howells A.M., Moss D.S., Titball R.W., Basak A.K. (2002). Crystal structure of the *C. perfringens* alpha toxin with the active site closed by a flexible loop region. *J. Mol. Biol.* 319(2):275–281.

Flores-Díaz, M. (2001). A UDP-glucose deficient mutant cell line as a model to study the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* PLC. Doctoral Thesis. Karolinska University Press. Stockholm, Sweden.

Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Titball, R.W., Moos, M., Guillouard, I., Cole, S., von Eichel-Streiber, C., Florin, I., Thelestam, M. (1998). UDP-glucose deficiency causes hypersensitivity to the cytotoxic effect of *Clostridium perfringens* phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 273(38): 24433–24438.

Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon.* 42(8):979-986.

- Fu, X., Wang, H., Hu, P. (2015). Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 72(9):1663-1677.
- Gutiérrez, J.M. (1989). Regeneración muscular posterior a mionecrosis inducida por veneno de la serpiente *Bothrops asper* (terciopelo): nuevas posibilidades para enfrentar un viejo problema. *Rev. Méd. Hosp. Nal. Niños Costa Rica.* 2(22):169-176.
- Gutiérrez, J.M, Ownby, C.L., Odell, G.V. (1984). Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). *Toxicon.* 22(5):719–731.
- Han, Y., Li, Y., Jia, L., Cheng, J.Z., Qi, Y.F., Zhang, H.J., Du, J. (2012). Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN-  $\gamma$  and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PLoS ONE.* 7(5): e35506.
- Hernández, R., Cabalceta, C., Saravia-Otten, P., Chaves, A., Gutiérrez, J.M., Rucavado, A. (2011). Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: Alterations in microvasculature and nerves. *PLoS ONE.* 6(5): e19834.
- Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., Koutsilieris, M. (2009). Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In vivo.* 23(5):779-796.
- Kalhovde, J.M., Jerkovic, R., Sefland, I., Cordonnier, C., Calabria, E., Schiaffino, S., Lømo T. (2005). “Fast” and “slow” muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J. Physiol.* 562: 847–857.
- Kitayama, J., Carr, M.W., Roth, S.J., Buccola, J., Springer, T.A. (1997). Contrasting responses to multiple chemotactic stimuli in transendothelial migration. Heterologous desensitization in neutrophils and augmentation of migration in eosinophils. *J. Immunol.* 158(5):2340–2349.

Kristjansson, R., Oddsson, A., Helgason, H., Sveinbjornsson, G., Arnadottir, G., Jensson, B., Jonasdottir, A., *et al.* (2016). Common and rare variants associating with serum levels of creatine kinase and lactate dehydrogenase. *Nat. Commun.* 3(7):10572. DOI: 10.1038/ncomms10572.

Lee, J., Cacalano, G., Camerato, T., Toy, K., Moore, M.W., Wood, W.I. (1995). Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J. Immunol.* 155(4):2158–2164.

Lee, Y.S., Yang, H., Yang, J.Y., Kim, Y., Lee, S.H., Kim, J.H., Jang, Y.J., Vallance, B.A., Kweon, M.N. (2015). Interleukin-1 (IL-1) signaling in intestinal stromal cells controls KC/CXCL1 secretion, which correlates with recruitment of IL-22-secreting neutrophils at early stages of *Citrobacter rodentium* infection. *Infect. Immun.* 83(8): 3257-3267.

Letterio, J.J., Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.* 16:137-161.

Li, J., Adams, V., Bannam, T.L., Miyamoto, K., García, J.P., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A. (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77(2):208-33.

Lu, H., Huang, D., Ransohoff, R. M., Zhou, L. (2011). Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* 25(10):3344–3355.

Lyrstis, M., Bryant, A.E., Sloan, J., Awad, M.M., Nisbet, I.T., Stevens, D.L., Rood, J.I. (1994). Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 12(5):761–777.

Naylor, C.E., Eaton, J.T., Howells, A., Justin, N., Moss, D.S., Titball, R.W., Basak, A.K. (1998). Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat. Struct. Biol.* 5:738–746.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25(12):677–686.

Monturiol-Gross, L., Flores-Díaz, M., Araya-Castillo, C., Pineda-Padilla, M.J., Clark, G.C., Titball, R.W., Alape-Girón, A. (2012). Reactive oxygen species and the MEK/ERK pathway are involved in the toxicity of *Clostridium perfringens* alpha-toxin, a prototype bacterial phospholipase C. *J. Infect. Dis.* 206(8):1218-1226.

O'Brien, D., Melville, S. (2004). Effects of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin (PLC) and Perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes to macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infect. Immun.* 72(9):5204-5215.

O'Brien, D., Therit, B., Woodman, M., Melville, S. (2007). The role of neutrophils and monocytic cells in controlling the initiation of *Clostridium perfringens* gas gangrene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50(1):86-93.

Oda, M., Kabura, M., Takagishi, T., Suzue, A., Tominaga, K., Urano, S., Nagahama, M., Kobayashi, K., Furukawa, K., Sakurai, J. (2012). *Clostridium perfringens* alpha-toxin recognizes the GM1a-TrkA complex. *J. Biol. Chem.* 287(39):33070-33079.

Palomo, J., Mastelic-Gavillet, B., Woldt, E., Troccaz, S., Rodriguez, E., Palmer, G., Siegrist, C.A., Gabay, C. (2016). IL-36-Induced toxicity in neonatal mice involves TNF- $\alpha$  production by liver myeloid cells. *J. Immunol.* 197(6):2239-2249. DOI: 10.4049/jimmunol.1600700.

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E., Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 5:532. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00532

Rigamonti, E., Touvier, T., Clementi, E., Manfredi, A., Bruneli, S., Rovere-Querini, P. (2013). Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *J. Immunol.* 190(4): 1767–1777.

Serrano, A., Muñoz-Cánoves, P. (2010). Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 316(18):3050-3058.

Sachdev, U., Cui, X., Xu, J., Xu, J., Tzeng, E. (2014). MyD88 and TRIF mediate divergent inflammatory and regenerative responses to skeletal muscle ischemia. *Physiol. Rep.* 2(5):e12006.

Shepard, L.A., Heuck, A.P., Hamman, B.D., Rossjohn, J., Parker, M.W., Ryan, K.R., Johnson, A.E., Tweten, R.K. (1998). Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated poreforming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry.* 37(41):14563e74.

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(2):996-1001.

Slater, C.R., Schiaffino, S. (2008). Innervation of regenerating muscle. En: Schiaffino S, Partridge T, eds. *Skeletal Muscle Repair and Regeneration.* Springer. Pp 303-333.

Smith, W.B., Gamble, J.R., Clark-Lewis, I., Vadas, M.A. (1993). Chemotactic desensitization of neutrophils demonstrates interleukin-8 (IL-8)-dependent and IL-8-independent mechanisms of transmigration through cytokine- activated endothelium. *Immunology.* 78(3):491–497.

Smith, R.E., Strieter, R.M., Zhang, K., Phan, S.H., Standiford, T.J., Lukacs, N.W., Kunkel SL. (1995). A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J. Leukoc. Biol.* 57(5):782-787.

Stevens, D.L., Mitten, J., Henry, C. (1987). Effects of alpha and theta toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.* 156(2):324–33.

Stevens, D.L., Tweten, R.K., Awad, M.M., Rood, J.I., Bryant, A.E. (1997). Clostridial gas gangrene: evidence that alpha and theta toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J. Infect. Dis.* 176:189-195.

Stevens, D.L. (2000). The pathogenesis of clostridial myonecrosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:497–502.

Stevens, D.L., Bryant, A.E. (2002). The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *Clin. Infect. Dis.* 35(Suppl 1):S93-S100.

Stevens, D.L., Titball, R.W., Jepson, M., Bayer, C.R., Hayes-Schroer, S.M., Bryant, A.E. (2004). Immunization with the C-Domain of  $\alpha$ -Toxin prevents lethal infection, localizes tissue injury, and promotes host response to challenge with *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* 190:767-773.

Stevens, D.L., Aldape, M.J., Bryant, A.E. (2012). Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe.* 18(2):254-9.

Takehara, M., Takagishi, T., Seike, S., Ohtani, K., Kobayashi, K., Miyamoto, K., Shimizu, T., Nagahama, M. (2016). *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -Toxin impairs innate immunity via inhibition of neutrophil differentiation. *Sci. Rep.* 6:28192.

Texeira, C.F., Zamunér, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Cruz-Hofling, M.A., Fernandes, I., Chaves, F., Gutiérrez, J.M. (2003). Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve.* 28(4):449-459.

Thacker, M., Clark, A., Bishop, T., Grist, J., Yip, P., Moon, L., Thompson, S., Marchand, F., McMahon, S.B. (2009). CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic states. *Eur. J. Pain.* 13(3):263-272.

Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K. (1999). The *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin. *Anaerobe.* 5(2):51–64.

Tidball, J. (2008). Inflammation in skeletal muscle regeneration. En: Skeletal muscle repair and regeneration. Series Editor. Vol. 3. 385 p.

Tidball, J., Villalta, A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298(5): R1173–R1187.

Tidball, J. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr. Physiol.* 1(4):2029-2062.

Tidball, J. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17(3):165-177.

Turner, N., Badylak, S. (2012). Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 347(3):759-774.

Uzal, F., Freedman, J., Shrestha, A., Theoret, J., García, J., Awad, M., Adams, V., Moore, R.J., Rood, J.I. (2014). Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 9(3):361-377.

Villalta, A., Rinaldi, C., Deng, B., Liu, G., Ferdor, B., Tidball, J. (2011a). Interleukin-10 reduces the pathology of *mdx* muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 20(4):790-805.

Villalta, A., Deng, B., Rinaldi, C., Wehling-Henricks, M., Tidball, J. (2011b). IFN- $\gamma$  promotes muscle damage in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy by

suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J. Immunol.* 187(10):5419-5428.

Williamson, E.D., Titball, R.W. (1993). A genetically engineered vaccine against alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects against experimental gas gangrene. *Vaccine.* 11(12):1253-1258.

Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214(2): 199-210.

Zhao, W., Lu, H., Wang, X., Ransohoff, R. M., Zhou, L. (2016). CX3CR1 deficiency delays acute skeletal muscle injury repair by impairing macrophage functions. *FASEB J.* 30:380–393.