

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología
Proyecto de graduación para optar por el grado de:
Licenciado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica

**Papel de los monocitos y macrófagos en la regeneración muscular esquelética en relación
con los eventos fisiopatológicos producidos por el envenenamiento con *Bothrops asper***

Eddie Vásquez Valerio

Comité asesor:

Dr. Fernando Chaves

Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez

Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

Revisión Bibliográfica

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2009

Dedicatoria

Para mis abuelos:

**Angel Antonio Vásquez López y Araminta Rivera Castro
Marco Emilio Valerio Solera y Mariela Meléndez Durán**

Quienes me han querido mucho, enseñado muchas cosas y les estoy muy agradecido.

Agradecimientos

A Dios por permitirme encontrar un camino para ser feliz y servir a los demás.

A mis padres y hermanos por su apoyo a través de mi vida. Sin ellos este trabajo no existiría. Este trabajo es de ellos.

También al Personal del Clodomiro Picado, en especial al Dr. Fernando Chaves, Dr. Bruno Lomonte y Dr. José María Gutiérrez por sus consejos a través de este proceso.

Agradezco muy especialmente a mi novia por apoyarme en mis proyectos y mis ideas y creer en mí.

Además, a mis amigos, profesores y a todas las personas que me han apoyado y me han permitido alcanzar este punto de mi vida. No puedo insistir suficiente en todo lo que les tengo que agradecer.



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 09 de enero del año 2009 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **EDDIE VASQUEZ VALERIO**, carné A13861, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dra. Marietta Flores Díaz PRESIDENTA
Dr. Javier Mora Rodríguez
Dr. Fernando Chaves Mora
Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez
Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

ARTICULO 1

La presidenta informa que el expediente de **EDDIE VASQUEZ VALERIO**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

El postulante **EDDIE VASQUEZ VALERIO**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Papel de los monocitos y macrófagos en la regeneración muscular esquelética en relación con los eventos fisiopatológicos producidos por el envenenamiento con *Bothrops asper*"

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

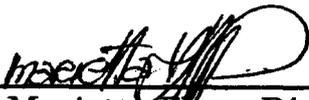
ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 95

ARTICULO 5

La presidenta del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de **Licenciado en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctor en Microbiología y Química Clínica**.

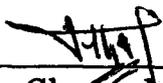
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 11:00 a.m horas.



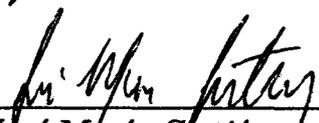
Dra. Marietta Flores Díaz
Presidenta



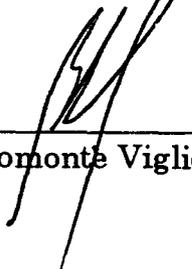
Dr. Javier Mora Rodríguez



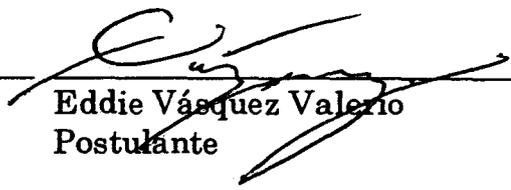
Dr. Fernando Chavés Mora



Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez



Dr. Bruno Lomonte Vigliotti



Eddie Vásquez Valerio
Postulante

Hoja de aprobación

Esta tesis fue aceptada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Facultad de Microbiología y Química Clínica como requisito parcial para optar por el grado de Licenciado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica.

Representante del Decano de la Facultad de Microbiología

Dr. Fernando Chaves

Tutor de Tesis

Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez

Asesor

Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

Asesor

Eddie Vásquez Valerio

Candidato

Contenido

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Hoja de aprobación.....	iii
Lista de imágenes y figuras.....	vi
Introducción.....	1
Justificación.....	1
Objetivos:.....	3
Objetivos secundarios.....	3
I. Envenenamiento experimental por <i>Bothrops asper</i>	4
1. Relevancia del estudio del envenenamiento.....	4
2. Fisiopatología del envenenamiento local.....	4
3. Histopatología del envenenamiento.....	4
3. Componentes del veneno.....	6
3.1 Fosfolipasas A ₂ (PLA ₂).....	6
3.2 SVMPs.....	7
4. Regeneración muscular experimental y reacción inflamatoria luego del envenenamiento.....	10
5. Papel de los neutrófilos y de las citoquinas luego del envenenamiento.....	11
II. Regeneración muscular esquelética.....	13
1. Generalidades de regeneración muscular esquelética.....	13
2. Células satélite (células precursoras miogénicas).....	15
2.1 Factores de transcripción Pax 7.....	17
3. Factores humorales que afectan la regeneración de las miofibras y la angiogénesis.....	18
3.1 Células satélite en regeneración muscular, rol de las MRFs.....	18
3.2 Papel de los factores secretados durante la regeneración de músculo esquelético.....	19
4. Papel de la vasculatura en la regeneración del músculo esquelético.....	25
5. Regeneración del músculo esquelético dañado por una toxina mionecrótica.....	25
6. Comparación entre los efectos de una toxina mionecrótica y un procedimiento que interrumpe la vascularización de músculo esquelético.....	26
III. Rol de macrófagos en la regeneración muscular esquelética.....	28
1. El macrófago en la regeneración muscular.....	28
1.1 El macrófago como célula estromal.....	29

2.	Citoquinas producidas por los macrófagos relacionadas con la regeneración muscular	30
3.	Factores que regulan la quimiotaxis de los macrófagos	30
4.	Efecto antiapoptótico de los macrófagos sobre miotubos y mioblastos	32
5.	Papel de los macrófagos en angiogénesis	34
5.1	Efecto quimiotáctico sobre macrófagos y angiogénico del VEGF	35
5.2	Efecto quimiotáctico sobre macrófagos y angiogénico del MCP-1	36
5.3	Papel de las enzimas degradativas de la matriz de los macrófagos en la angiogénesis...	37
5.4	Cooperación intercelular	37
6.	Subtipos de macrófagos en la regeneración muscular esquelética	38
6.1	Separación fenotípica de los macrófagos en subtipos	38
6.2	Cinética de los subtipos de macrófagos durante la regeneración muscular.....	41
6.3	Secreción diferencial de citoquinas por parte de los subtipos de macrófagos.....	43
6.4	Fagocitosis de debris celular en relación con el cambio fenotípico de los subtipos de macrófagos.....	43
6.5	Papeles diferenciados de los subtipos de macrófagos sobre mpcs	44
6.6	Papeles diferenciados de los subtipos de macrófagos en la regeneración muscular esquelética.....	44
6.7	Estudios espacio-temporales.....	45
7.	Estrategias utilizadas para alterar la función de los macrófagos en la regeneración de las heridas.....	45
7.1	Efecto de la alteración de la función de los macrófagos en la regeneración	45
	Conclusión	48
	Bibliografía.....	57
	Anexos	80
	Liposomas.....	81
	Preparación de liposomas	83
	Protocolo de inyección de los liposomas para obtener depleción de macrófagos por tiempos mayores.....	84
	Metodologías para determinar los subtipos de macrófagos en músculo esquelético	84

Lista de imágenes y figuras

Figura 1. Fases que caracterizan al proceso de regeneración muscular luego de una lesión.

Figura 2. Ubicación de la célula satélite en relación con la fibra muscular.

Figura 3. Ciclo de las células satélite durante la regeneración.

Figura 4. Papel de las células precursoras miogénicas dentro de la regeneración muscular esquelética.

Figura 5. Esquema que muestra la miogénesis de las células satélite y marcadores típicos de cada etapa.

Figura 6. Detalle de una célula satélite utilizando microscopía electrónica.

Figura 7. Relevancia de la integridad vascular en la regeneración de tejido muscular.

Figura 8. Funciones del macrófago dentro de la regeneración muscular.

Figura 9. Patrones observados en citometría de flujo utilizados para separar los dos subtipos de monocitos presentes en sangre.

Figura 10. Cantidades diferenciales de los dos subtipos de MO/MP en diferentes tiempos, luego de la administración de notexina.

Figura 11. Progreso de la regeneración observado luego de la inyección con notexina en relación con los subtipos de macrófagos.

Figura 12. Progreso hipotético de la regeneración luego de la inyección con miotoxina en relación con los subtipos de macrófagos.

Figura 13. Progreso hipotético de la regeneración luego de la inyección con hemorragina en relación con los subtipos de macrófagos.

Figura 14. Esquema que muestra los factores de crecimiento y las citoquinas más implicadas en la regeneración muscular y su relación con los macrófagos.

Lista de abreviaturas

- **CL2MBP: dichloromethylene bisphosphonate**
- **CLO-LIP: liposomas con clodronato**
- **CK: creatin quinasa**
- **D/D: denervación/ devascularización**
- **EGF: factor de crecimiento epidermal**
- **FKN: fractalkine**
- **FGF: factor de crecimiento de fibroblastos**
- **HGF: factor de crecimiento de los hepatocitos**
- **IFN γ : interferón gama**
- **IGF: factor de crecimiento insulínico**
- **IL: interleucina**
- **IL-1: interleucina 1**
- **IL-4: interleucina 4**
- **IL-6: interleucina 6**
- **LIF: factor inhibidor de la leucemia**
- **MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1**
- **MCS-F: factor estimulante de colonia de los macrófagos**
- **MDC: : quimioquina derivada de macrófagos CCL22**
- **Mpc: célula precursora miogénica**
- **MRF: factor regulador miogénico**
- **MO: monocito**
- **MO/MP: monocito/macrófago**
- **MP: macrófago**
- **PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas**
- **PLA2: fosfolipasa A2**
- **SSC^{lo}: Side scatter low (dispersion lateral baja)**

- **SVMPs: Metaloproteinasas de veneno de serpiente**
- **TGF β : Factor transformante de crecimiento beta**
- **TNF α : factor de necrosis tumoral alfa**
- **uPAR: sistema activador del plasminógeno tipo urokinasa**
- **VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular**

Introducción

En la siguiente revisión se analizarán los aspectos más importantes de la regeneración muscular, en el marco del envenenamiento por la serpiente *Bothrops asper*. Con esto se pretende mostrar cuál es el estado de las investigaciones más pertinentes al respecto, otorgándole especial atención a protagonistas celulares y citoquinas relacionadas en la producción del microambiente que se genera durante la regeneración normal del tejido muscular y al mismo tiempo contrastarlo con las observaciones experimentales de regeneración luego del envenenamiento.

Se analizarán las acciones que podrían ser producidas por el macrófago en la regeneración y su injerencia, tanto en el efecto mionecrótico, como hemorrágico del veneno. Por otro lado, se mostrarán los datos existentes respecto a subtipos de macrófagos para, de esta manera, guiar la investigación hacia su estudio. Lo anterior se justifica ya que en los eventos espacio-temporales que se observan en la regeneración se requiere prestar atención, no solo al número de macrófagos sino también a su fenotipo.

En el caso de los macrófagos, es importante indicar su importancia como célula estromal en la regeneración de músculo esquelético y la manera en la que sus diferentes subtipos pueden afectar dicha regeneración por medio de actividades celulares directas (fagocitosis), indirectas o a distancia (citoquinas, factores reguladores y quimiotácticos).

Justificación

Bothrops asper es la serpiente venenosa más importante de América Central. (Gutiérrez y Lomonte, 1995). El daño muscular por mordedura de serpiente típicamente produce una pobre regeneración lo cual deja secuelas serias en el paciente envenenado. Esto por cuanto el suero antiofídico, o antiveneno, disminuye el progreso del daño, pero los efectos inmediatos como la lesión de la vasculatura o la mionecrosis no pueden ser resueltos por el antiveneno lo que lleva a

la necesidad de generar estrategias que permitan acceder de manera efectiva a una buena regeneración muscular.

Para lograr que esa regeneración muscular suceda de la mejor manera, se debe primeramente, conocer el proceso de regeneración muscular natural luego del daño muscular esquelético. También se debe conocer los tipos celulares implicados con dicha regeneración y las moléculas de señalización que permiten la comunicación entre los elementos más relevantes de dicho sistema, donde la regeneración, lejos de ser un evento sencillo de proliferación, en realidad requiere de la colaboración orquestada de diferente tipos celulares, tanto musculares como inflamatorias, en constante comunicación.

Objetivos:

El objetivo principal de este trabajo es describir y analizar el papel de los monocitos/macrófagos en la regeneración de músculo esquelético y su relación con los datos existentes de regeneración luego de envenenamiento con veneno de *B. asper*.

Objetivos secundarios

- 1. Identificar los factores principales que intervienen en el proceso de regeneración muscular esquelética, tanto los factores celulares como los humorales (citoquinas).**
- 2. Establecer una relación entre la regeneración muscular observada en otros modelos (denervación/devascularización y mionecrosis inducida por notexina) y la lesión que se da en el envenenamiento con veneno completo, con miotoxina y con metaloproteinasas.**
- 3. Identificar las metodologías que han sido utilizadas para mejorar la regeneración en heridas.**
- 3. Sugerir alternativas prácticas experimentales para el estudio del papel de los macrófagos en la regeneración muscular esquelética. Lo anterior en aras de definir estrategias terapéuticas apropiadas para pacientes víctimas de envenenamiento por *B. asper*.**

I. Envenenamiento experimental por *Bothrops asper*

1. Relevancia del estudio del envenenamiento

En América Latina, la mayoría de mordeduras de serpiente son causadas por especies del género *Bothrops*, y los efectos locales son una importante consecuencia de este envenenamiento. Dichos efectos todavía no son neutralizados del todo por la seroterapia con antiveneno convencional (Avila-Agüero et al. 2001), por lo que entre las secuelas del envenenamiento se encuentran la pérdida permanente de tejido, invalidez y amputación de la extremidad afectada (Cardoso et al., 1993).

2. Fisiopatología del envenenamiento local

La patogénesis de los efectos locales inducidos por el veneno comprende la acción combinada de elementos del veneno como proteinasas y fosfolipasas (Gutiérrez et al., 1995a) que, además de inducir alteraciones patológicas de aparición rápida como hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis, producen una inflamación compleja, con edema, hiperalgesia y abundante infiltrado leucocitario (Gutiérrez et al., 1980; Gutiérrez et al., 1986). Así mismo, se observa una pobre regeneración, y un lento incremento de creatina quinasa (CK) en músculo (al utilizarlo como marcador de regeneración muscular) (Gutiérrez et al., 1986).

Por las razones anotadas anteriormente, el tratamiento del efecto local del envenenamiento ofídico se complica por el hecho de que el antiveneno, aun administrado poco tiempo después del accidente, solo neutraliza parcialmente dicho efecto (Gutiérrez y Bolaños, 1980).

3. Histopatología del envenenamiento

Experimentalmente se ha observado, luego de una hora posterior a la inyección de veneno completo, mionecrosis con predominio de fibras musculares de aspecto miolítico que se vuelve

más evidente a las 3 horas y llega a ser intensa a las 6, 9, 12 y 24 horas. En dichos cortes histológicos se observan fibras necróticas de aspecto miolítico y coagulativo con predominio de las primeras. Por su lado el cuadro hemorrágico llega a su máximo nivel a las 9, 12 y 24 horas (Gutiérrez et al., 1980).

En el infiltrado inflamatorio que sigue de la inyección de veneno de *B. asper* se da una presentación secuencial de varios tipos celulares. Se observa un aumento marcado de leucocitos a las 24 horas en el gastronemio de ratón inyectado con veneno respecto al ratón control y la elevación más prominente se observa a las 48 horas; esta se constituye casi exclusivamente de neutrófilos (Gutiérrez et al., 1980). El primer tipo celular en presentarse es el polimorfonuclear neutrófilo que se encuentra ya desde las primeras 6 horas luego del envenenamiento; es importante anotar que en este momento ya no hay degradación miofibrilar adicional (Gutiérrez et al., 1986). Dicha población celular se mantiene como predominante a las 6 y 24 horas posteriores al envenenamiento. Por otro lado, a las 48 horas cambia el patrón y se da un aumento de la población de macrófagos mientras que la de polimorfonucleares disminuye. Así, los macrófagos continúan siendo la población predominante inclusive a las 72 horas (Gutiérrez et al., 1986).

Existe evidencia de degradación miofibrilar importante luego de 48 horas del envenenamiento. Dicha degradación puede ser producto de una actividad de los macrófagos, no hacia la mionecrosis (reflejada en el aumento de CK) sino a la degradación miofibrilar (Gutiérrez et al., 1986). Histológicamente se observan áreas de fibrosis mezcladas con músculo en regeneración y diámetro de fibras musculares anormalmente pequeño aún cuatro semanas luego del envenenamiento (Gutiérrez et al., 1986). Aún en ausencia de la actividad hemorrágica del veneno (por medio de neutralización), para el día 28 se observa una regeneración incompleta (Gutiérrez et al., 1986).

Es importante destacar que, como producto de estas investigaciones (Gutiérrez et al., 1986), se ha demostrado cómo las células inflamatorias tienen un rol en la degradación y eliminación de material necrótico de la lesión pero no desarrollan daño tisular adicional, sino que los efectos mionecróticos en el tejido se dan por cuenta de otros factores como el efecto directo del veneno, la hemorragia y la isquemia (Gutiérrez et al., 1986).

Desde la histopatología de la lesión, se pueden separar dos tipos de necrosis de acuerdo con la apariencia de las fibras, a saber:

1. La miolítica: que se caracteriza por la destrucción evidente del material tisular.
2. La coagulativa: en que las fibras musculares muestran un material intracelular de aspecto hialino y homogéneo.

En este sentido se apunta que la gran mayoría de las serpientes de Costa Rica producen un cuadro mixto de zonas miolíticas y coagulativas simultáneamente (Gutiérrez et al., 1980b).

3. Componentes del veneno

Los efectos observados luego del envenenamiento se deben principalmente a dos componentes presentes en el veneno: metaloproteinasas dependientes de zinc (SVMPs) y fosfolipasas A₂ miotóxicas (PLA₂). Las SVMPs inducen hemorragia, con ampollamiento, dermonecrosis y degradación de la matriz extracelular en general. Además, las alteraciones vasculares pueden llevar a lesión vascular, edema y contribuir a la producción de isquemia y mionecrosis tisular. Por otro lado, las PLA₂ inducen mionecrosis y afectan también a los vasos linfáticos (Gutiérrez et al., en revisión 2008).

3.1 Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

El veneno de *B. asper* induce una prominente mionecrosis local (Gutiérrez y Ownby, 2003). Esta mionecrosis local es causada principalmente por las PLA₂ (Gutiérrez et al., 1995; Gutiérrez y Lomonte, 1997). La inyección de PLA₂ resulta en una rápida mionecrosis que se constata por alteraciones histológicas e incremento de enzimas de origen muscular, como la CK (Gutiérrez et al., 1980). También se ha demostrado experimentalmente que estas PLA₂ producen actividad citotóxica en mioblastos y miotubos en cultivo (Angulo y Lomonte, 2005).

3.1.1 Efecto mionecrótico de las fosfolipasas

El ataque inicial de miotoxinas de *B. asper* en la fibra muscular ocurre en la membrana plasmática con una rápida lesión de la integridad del sarcolema. A nivel ultraestructural se han determinado abundantes interrupciones focales en la periferia de la fibra muscular (Gutiérrez et al., en revisión 2008). Por otro lado, células musculares maduras y los miotubos son los que muestran la mayor susceptibilidad a esas toxinas (Angulo y Lomonte, 2005). En observaciones

experimentales, las fosfolipasas miotóxicas no parecen afectar a las células satélite miogénicas (Gutiérrez y Ownby, 2003).

3.2 SVMPs

Las metaloproteinasas dependientes de zinc (SVMPs), son la fracción del veneno responsable de la actividad hemorrágica. Pertenecen a la familia M12 de las reprotolisinas (Bjarnason y Fox, 1994).

Estas toxinas se han dividido en cuatro grupos:

- Grupo 1: enzimas que presentan solo el dominio metaloproteinasa
- Grupo 2: enzimas que contienen un dominio metaloproteinasa y un dominio disintegrina
- Grupo 3: dominios metaloproteinasa, similar a disintegrina y rico en cisteína en una misma cadena polipeptídica.
- Grupo 4: heterodímeros con una subunidad correspondiente a una cadena P3 y otra que es un dominio lectina tipo C.

Las hemorraginas más potentes corresponden a la clase 3. En *B. asper* se han descrito SVMP's de las clases 1, 2 y 3. Sin embargo la tipo 1 es la que se ha determinado en mayor cantidad en especímenes adultos (Gutiérrez y Lomonte, 1995; Alape et al., 2008).

El daño en la microvasculatura por parte de las SVMPs es señalado como el principal responsable de la pobre regeneración muscular luego de los efectos patológicos inducidos por el veneno, que lleva a la pérdida permanente del tejido y ausencia de funcionalidad (Gutiérrez et al., en revisión 2008). La lesión en el endotelio se da en vasos capilares y vénulas por la acción de las toxinas hemorrágicas con la consecuente extravasación. Además se da la formación de edema por la acción de mediadores inflamatorios y un aumento en la permeabilidad capilar (Chaves et al., 1995; Gutiérrez y Lomonte, 2003; Teixeira et al., 2003). Dicho edema es importante ya que el aumento de fluido intersticial en el compartimiento muscular aumenta la presión intracompartimental. Cuando esta presión aumenta más de 40 mmHg se desarrolla un síndrome compartimental que lleva a deficiencia en la perfusión de regiones distales y daño isquémico (Warrell, 1999).

Las células endoteliales presentan las siguientes alteraciones bajo la acción de SVMPs:

- 1- Reducción del grosor celular y de las vesículas pinocitóticas.
- 2- Aparición de pequeños *blebs* protruyendo de la célula al lumen vascular.
- 3- Hinchamiento mitocondrial
- 4- Pérdida de integridad de la célula endotelial.

Además se da la pérdida de continuidad de la membrana basal en algunos lugares (Moreira et al., 1992; Moreira et al., 1994; Gutiérrez et al., 2006).

En estudios realizados en el tema se sugiere un mecanismo de dos pasos para la consecución de la hemorragia observada *in vivo* (Gutiérrez et al., 2005):

- 1- Hidrólisis de enlaces clave en proteínas de la membrana basal y de proteínas de membrana que unen a las células endoteliales con la membrana basal. Lo anterior produce debilidad de la pared de los vasos capilares y de las células endoteliales al tiempo que se altera la interacción endotelio-lámina basal (Gutiérrez et al., 2005).
- 2- Los factores biofísicos que actúan *in vivo*, como la presión transmural que actúa en la pared capilar causa distensión en la pared capilar. Además, el estrés causado por la tensión de fricción (*shear*), lo cual distiende a los capilares debilitados e induce una lesión mecánica al endotelio (Gutiérrez et al., 2005).

Como consecuencia del debilitamiento por proteólisis de la membrana basal, la presión tangencial induce la distensión de la pared capilar, que resulta en la lesión de la integridad de la célula endotelial y la consecuente extravasación de fluidos y células (Gutiérrez et al., 2005).

Por otra parte, se ha observado que la incubación con BaH1, la metaloproteinasa más fuerte y abundante en el veneno de *Bothrops asper*, no induce citotoxicidad directa al adicionarla a músculo gastronemio *in vitro*. Y se ha observado que en ausencia de circulación, la metaloproteinasa no ejerce el efecto hemorrágico que se observa *in vivo* (Gutiérrez et al., 1995b). Sin embargo observaciones experimentales demuestran que las SVMPs hemorrágicas como la BaH1 y la BaP1 inducen mionecrosis también (Rucavado et al., 1995). La hipótesis que lo

explica es el daño muscular que se produce debido a la isquemia. La angionecrosis y la trombosis que se desarrollan también afectan la perfusión del tejido (Gutiérrez et al., en revisión 2008).

3.2.1 Efectos hemorrágicos de las metaloproteinasas

La inyección de veneno de *B. asper*, o SVMPs aislados en modelo animal, induce una hemorragia rápida. Experimentos en modelo animal han evidenciado que la actividad metaloproteinasa es un requisito absoluto para el efecto hemorrágico y que las SVMPs son los únicos componentes hemorrágicos del veneno (Gutiérrez et al., en revisión 2008). También se ha visto como las metaloproteinasas dependientes de zinc, como la BaH1, no producen una citotoxicidad directa sobre las células musculares. Además se ha determinado que la lesión causada por la metaloproteinasa, se debe a la isquemia que se desarrolla a raíz de la hemorragia. Estos factores demuestran por qué las áreas de tejido muscular más afectadas son las que se encuentran más cercanamente a las zonas donde hubo ruptura de la vasculatura (Gutiérrez et al., en revisión 2008).

En los estudios realizados con la fracción BaH1 del veneno de *B. asper*, se pueden identificar tres tipos de patrones histológicos:

- 1- Fibras musculares en regeneración con núcleos en posición central y con un poco de fibrosis.
- 2- Áreas con escasas fibras en regeneración de diámetro reducido y rodeadas de macrófagos y fibroblastos, con fibrosis prominente en algunas regiones e inclusiones cristalinas.
- 3- Remanentes de células necróticas con material miofibrilar desorganizado y macrófagos.

Es importante recalcar que de los patrones anteriores, observados experimentalmente, en el segundo y el tercer tipo en mención los vasos capilares eran escasos (Gutiérrez et al., 1995b).

4. Regeneración muscular experimental y reacción inflamatoria luego del envenenamiento

Los eventos degenerativos luego del envenenamiento incluyen una reacción inflamatoria aguda asociada con dolor, edema y reclutamiento de polimorfonucleares y macrófagos (Gutiérrez et al., 1984). Tiempo después de la lesión, se instaura un proceso regenerativo con activación de células satélite miogénicas y la fusión de mioblastos para la formación de miotubos (Gutiérrez et al., 1986). Este proceso de regeneración muscular es bastante pobre luego de inyecciones con veneno de *B. asper*, ya que produce tanto daños mionecróticos, como las alteraciones vasculares, hemorragia y trombosis anteriormente mencionadas (Gutiérrez et al., 1986a).

Así, en aras de dilucidar el proceso de regeneración muscular luego del envenenamiento, se han conducido experimentos de mayor duración, en los que se ha observado que, en muestras obtenidas a los 7 días luego de la inyección de veneno completo, se observa una gran cantidad de fibroblastos, así como áreas de regeneración muscular con células regenerativas pequeñas y exudado tipo mononuclear sin presencia de áreas hemorrágicas, (Gutiérrez et al., 1980 a) además de tejido adiposo escaso (Gutiérrez et al., 1986b). También, en algunas porciones se encuentran células musculares necróticas sin remover notándose escaso infiltrado en estas áreas y las células necróticas contienen material miofibrilar. Además, cabe destacar que se observaron macrófagos y neutrófilos presentes aun en el tejido (a los 7 días) (Gutiérrez et al., 1986). Por otro lado, en algunas áreas de tejido necrosado hay una ausencia casi total de células inflamatorias hasta una semana después del envenenamiento (Gutiérrez et al., 1986). A los 7 y 14 días la imagen predominante es una fibrosis con infiltrado granular. Más tarde, a los 28 días, se ve un decremento de masa muscular y áreas fibróticas periféricas con pequeñas fibras musculares en regeneración (Gutiérrez et al., 1986b).

En la mionecrosis inducida por miotoxinas, que afectan solo células musculares sin inducir hemorragia, se observa que el tejido necrótico se elimina por fagocitosis en los primeros 2 a 3 días (Harris, 2003). Así mismo, se ha visto que en experimentos realizados con notexina, y otras

toxinas únicamente miotóxicas, la regeneración es excelente luego de un mes (Gutiérrez et al., 1986a).

Una regeneración completa del tejido muscular requiere de factores como: buena perfusión del tejido, inervación, remoción de fibras necróticas, y la permanencia de la membrana basal; de ahí que la regeneración luego de la administración de PLA₂ sea completa, ya que cumple con estos requisitos (Gutiérrez et al., 1984; Harris, 2003). Por la misma razón, cuando el músculo se inyecta con el veneno completo o la fracción SVMP aislada, se produce un efecto drástico en la microvasculatura (Gutiérrez et al., 1984) y la regeneración es parcial y deteriorada, ya que esos requisitos no se satisfacen (Rucavado et al, 1995).

5. Papel de los neutrófilos y de las citoquinas luego del envenenamiento

En experimentos realizados depletando neutrófilos antes del envenenamiento y luego del mismo, el efecto que se observa es un retraso de la regeneración, la cual se encuentra deficiente y retardada (Teixeira et al., 2003). De manera que la importancia de los neutrófilos en la regeneración se atribuye a que, al ser fagocitos profesionales, los mismos remueven restos celulares musculares y proveen mediadores que estimulan el reclutamiento de macrófagos al sitio de lesión (Gutiérrez et al., en revisión 2008).

Al inyectarle veneno de *B. asper* en músculo de ratón, miotoxinas o toxinas hemorrágicas, se incrementan las citoquinas en tejido lesionado y músculo (Chaves et al., 2005). El mayor incremento descrito de citoquinas en tejido muscular es el de IL-6 e IL-1 β mientras que el TNF- α no mostró elevaciones (Lomonte et al., 1993; Rucavado et al., 2002; Chaves et al., 2005). Al tratar a los ratones con inhibidores de la transcripción de TNF- α , o anticuerpos contra TNF- α , IL-1 β o IL-6, no se modificó el efecto hemorrágico, el edema ni la mionecrosis causada por el veneno de *Bothrops asper* en músculo esquelético (Chaves et al., 2005).

Por las razones anteriores, se descarta a dichas citoquinas como efectoras de daño en músculo esquelético y más bien se indica que la reacción inflamatoria prominente que se desarrolla parece

participar en los procesos de regeneración y reparación (Gutiérrez et al., 2007).

II. Regeneración muscular esquelética

1. Generalidades de regeneración muscular esquelética

Una herida es la discontinuidad de la integridad del tejido, mientras que la regeneración es la reconstitución de dicha integridad. Dicho daño induce reacciones inflamatorias, deposición de matriz y resolución, los cuales son componentes esenciales para que sane el tejido (Chargé y Rudnicki, 2004). Por otro lado, la cicatrización es un proceso en el que no ocurre una resolución real ya que existe una activación prolongada de genes que codifican para moléculas fibrogénicas que distinguen a la reparación de una herida, de lo que se observa en una cicatrización patológica (Razzaque et al., 2005). Esta última resulta de la deposición de proteínas de matriz que continua a pesar de la resolución o la desaparición del estímulo que generó el proceso inflamatorio inicialmente. Así, los fibroblastos activados serían los responsables en parte de este proceso, al reemplazar el tejido normal por tejido de cicatrización alterando la funcionalidad del tejido, en este caso, el músculo esquelético (Razzaque et al., 2005).

Sin importar si el músculo resiste trauma directo o si es por un defecto innato, la regeneración muscular se caracteriza por dos fases (Chargé y Rudnicki, 2004):

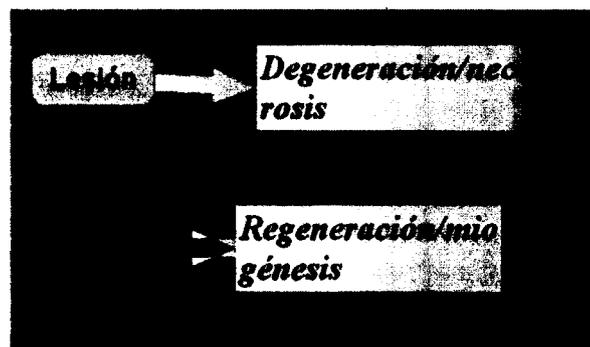


Figura 1. Fases que caracterizan al proceso de regeneración muscular luego de una lesión. Tomado de Chargé y Rudnicki, 2004.

El evento inicial de la degeneración muscular es la necrosis de las fibras musculares y este es activado generalmente por la lesión del sarcolema que resulta en una permeabilidad incrementada de la miofibrilla (Chargé y Rudnicki, 2004).

La fase inicial de la lesión muscular se acompaña usualmente de la activación de células inflamatorias y células miogénicas. En general, los mediadores inflamatorios que se producen localmente luego de la lesión, comienzan a reclutar neutrófilos dentro de las primeras 24 horas luego del insulto, con una aumentada proliferación de las células del epitelio basal. (Razzaque et al., 2005). Los factores liberados por células residentes en músculo proveen de señales quimiotácticas a las células inflamatorias en circulación (Rappolee y Werb, 1992; Tidball, 1995). Así, los neutrófilos son las primeras células inflamatorias en invadir el músculo dañado, con un aumento significativo de su número a las 1-6 horas luego de la mionecrosis inducida, por ejemplo, con bupivacaína (Orimo et al., 1991). Los neutrófilos infiltran el sitio dañado para fagocitar restos celulares y pueden afectar otros aspectos de regeneración muscular al activar células miogénicas (Almekinders y Gilbert 1986; Lescaudron et al., 1999; Merly et al., 1999; Robertson et al., 1993).

Aproximadamente 48 horas después de la lesión, los macrófagos se vuelven la célula inflamatoria predominante en el sitio de lesión (Orimo et al., 1991; Tidball et al., 1995), de tal forma que la mayoría de los neutrófilos son reemplazados por macrófagos, al tiempo que se vuelve aparente el tejido granular y fibroblastos en proliferación embebidos en matriz extracelular y la aparición de nuevos vasos sanguíneos (Razzaque et al., 2005). De esta manera, la necrosis de fibra muscular y un incremento en las células mononucleares en el tejido lesionado son las características histopatológicas del evento temprano que se sigue de la lesión muscular (Chargé y Rudnicki, 2004).

Una consideración importante respecto al proceso de regeneración muscular es que se da de forma centripeta (de regiones externas a internas), lo que resulta en la formación de diferentes zonas con músculo en regeneración, cada zona en una fase diferente de degeneración/regeneración (Carlson y Gutmann, 1975).

También es importante anotar que las propiedades funcionales del músculo esquelético dependen del mantenimiento de una red compleja de miofibras, neuronas motoras, vasos sanguíneos y matriz de tejido conectivo extracelular (Chargé y Rudnicki, 2004). Al ser el músculo esquelético un tejido altamente vascularizado, que provee nutrientes esenciales para la función muscular, la microvasculatura es esencial para diferentes funciones (Chargé y Rudnicki, 2004). Además, la revascularización y también la reinervación y reconstitución de matriz extracelular también son aspectos esenciales para el proceso de regeneración muscular (Chargé y Rudnicki, 2004).

2. Células satélite (células precursoras miogénicas)

La regeneración del músculo esquelético resulta de la activación, proliferación y fusión de células precursoras miogénicas que residen bajo la lámina basal de la fibra muscular, llamadas células satélite (Hawke y Garry, 2001). Las células satélite quiescentes son físicamente distintas de la miofibra adulta, en tanto que residen en depresiones entre la lámina basal y el sarcolema (Muir et al., 1965), localizadas entre la membrana plasmática y la lámina basal de la fibra muscular adulta (posición sublaminar), se consideran como los precursores del músculo esquelético en regeneración (Mauro, 1961). La célula satélite puede ser distinguida del mionúcleo por una lámina basal que la envuelve, por una razón relativamente alta núcleo/citoplasma con pocas organelas, un núcleo pequeño comparado con el núcleo adyacente del miotubo y por la heterocromatina más abundante. Por lo tanto, una de las características definitoria de la célula satélite es que la lámina basal que envuelve a la célula satélite y la miofibrilla asociada son continuas (Schultz et al., 1994).

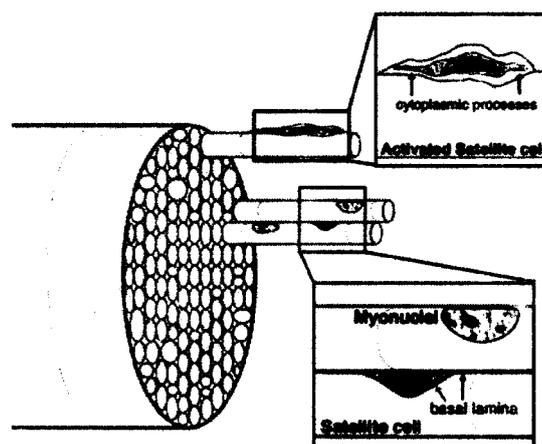


Figura 2. Ubicación de la célula satélite en relación con la fibra muscular. Tomado de Hawke y Garry, 2001.

Esto indica que la célula satélite es quiescente desde el punto de vista mitótico, y transcripcionalmente más inactiva que el núcleo de la miofibrilla (Schultz et al., 1978; Snow, 1983). Además, la especificación de los linajes miogénicos requiere la regulación aumentada de MyoD y Myf5, los cuales son activadores transcripcionales de la familia de factores reguladores miogénicos (MRF) (Chargé y Rudnicki, 2004), su determinación se constituye en un método para diferenciar células satélite quiescentes, de las que no lo son.

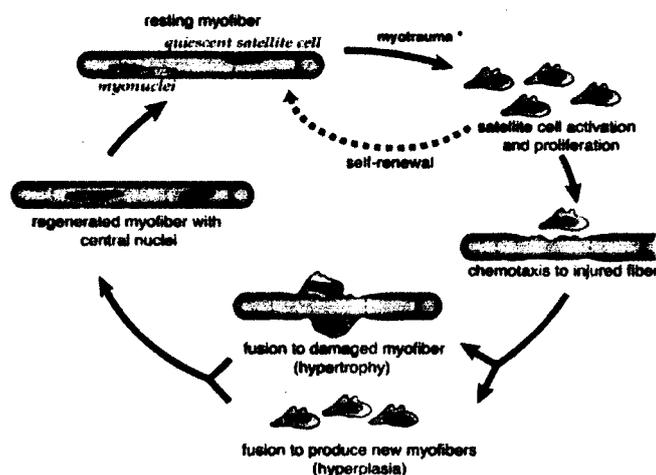


Figura 3. Ciclo de las células satélite durante la regeneración. Tomado de Hawke y Garry, 2001.

Luego de la activación, las características anteriormente mencionadas cambian para dar paso a células más fácilmente identificables, ya que da la impresión de que la miofibrilla se hincha con un proceso citoplasmático que se extiende de uno o ambos polos de la célula. Finalmente, las fibras musculares adultas son terminalmente diferenciadas de manera que se alcance el crecimiento y regeneración muscular (Hawke y Garry, 2001). Importante destacar que las células quiescentes no expresan factores reguladores miogénicos de la familias MyoD o MEF2 u otros marcadores de diferenciación terminal conocidos (Hawke y Garry, 2001).

Se han tratado de desarrollar marcadores moleculares específicos para la población de células satélite. Uno de ellos es el gen Pax7 que se verá a continuación. Por otro lado, la laminina se utiliza para visualizar la lámina basal y la distrofina para identificar el sarcolema y de esta

manera diferenciar por microscopía a una célula muscular de una célula satélite (Chargé y Rudnicki, 2004).

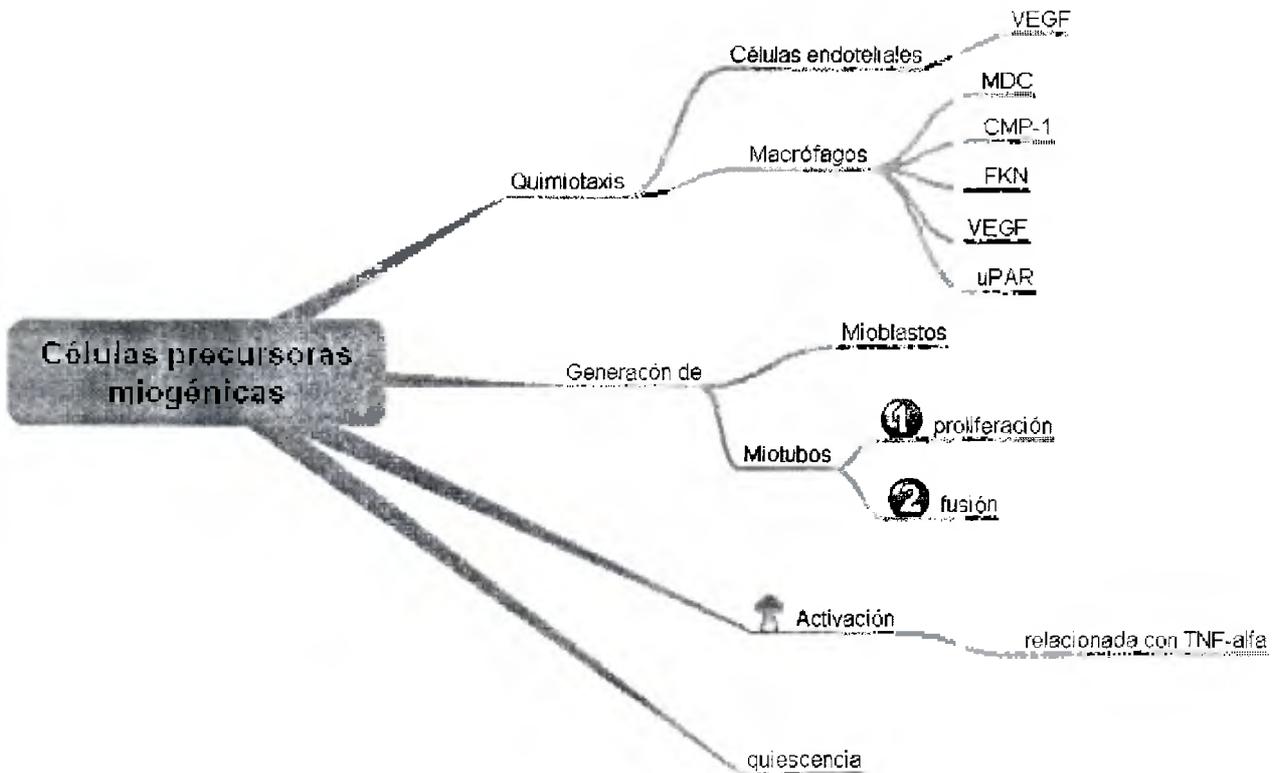


Figura 4. Papel de las células precursoras miogénicas dentro de la regeneración muscular esquelética.

2.1 Factores de transcripción Pax 7

El gen Pax7 se expresa específicamente en cultivos de células satélite y se expresa en células satélite quiescentes y activadas *in vivo* (Hubank y Schatz, 1994; Seale et al., 2000). Por medio de análisis de la distribución de ARNm de Pax7, se ha demostrado la expresión de Pax7 en mioblastos derivados de células satélite y una rápida disminución de transcritos de Pax7 en la diferenciación miogénica (Seale et al., 2000). Así mismo, la expresión diferencial de isoformas del gen Pax-7 y de MyoD ha sido correlacionada con la eficiencia en la reparación del tejido muscular. (Kay et al., 1993; Maley et al., 1994; Kay et al., 1995; Kay et al., 1998).

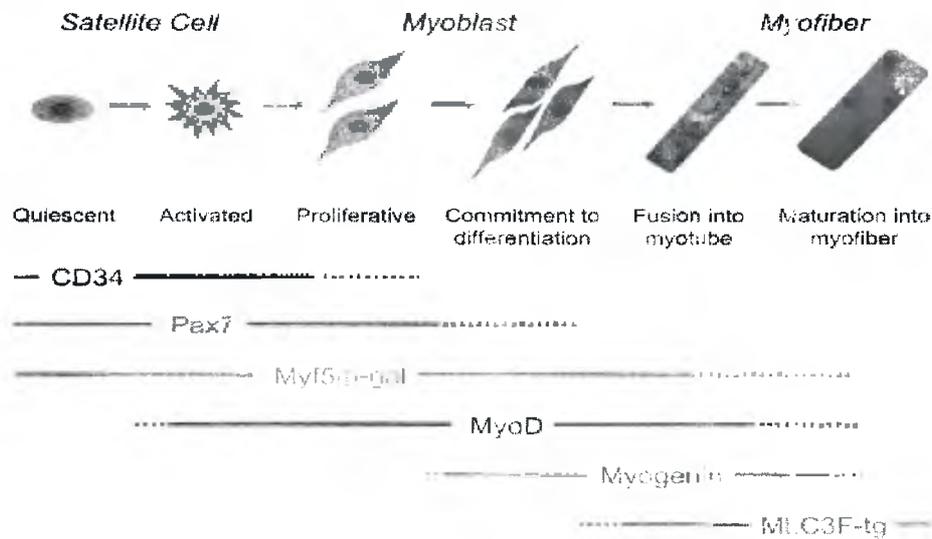


Figura 5. Esquema que muestra la miogénesis de las células satélite y marcadores típicos de cada etapa. Tomado de Zammit et al., 2006.

3. Factores humorales que afectan la regeneración de las miofibras y la angiogénesis.

3.1 Células satélite en regeneración muscular, rol de las MRFs:

Gracias a la expresión de señales del ambiente dañado, las células satélite son activadas y comienzan a proliferar en lo que se conoce como células precursoras miogénicas (mpc) o mioblastos adultos. Luego de la proliferación, las células satélite quiescentes se alojan bajo la lámina basal listas para rondas subsecuentes de regeneración (Schultz et al., 1985). En un nivel molecular, la activación de mpcs se caracteriza por el rápido aumento de 2 MRFs que son el Myf5 y el MyoD (Fuchtbauer y Westphal, 1992; Grounds et al., 1992; Maley et al., 1994; Smith et al., 1994; Yablonka-Reuveni y Rivera, 1994; Rantanen et al., 1995; Cornelison y Wold 1997; Cooper, 1999; Cornelison et al., 2000; Zammit et al., 2002). La familia MyoD juega un papel integral en la miogénesis del músculo esquelético, puesto que la expresión de MyoD y Myf5 está involucrada en la determinación del destino miogénico de las células precursoras. De manera que el MyoD juega un rol importante en la salida del ciclo celular de mioblastos en diferenciación (Guo et al., 1995; Halevy et al., 1995), expresión genética músculo específica (Tapscott. et al., 1988; Rudnicki. et al., 1993) y formación de miotubos (Cornelison et al., 2000). Por su parte, el TNF- α disminuye la abundancia de MyoD en mioblastos en diferenciación (Langen et al., 2004). Por otro lado, la expresión de miogenina y MRF4 están asociados con la diferenciación

terminal de dichas células (Hawke y Garry, 2001). Vale destacar que en general las mpcs quiescentes no presentan ningún nivel detectable de MRFs (Fuchtbauer y Westphal, 1992; Grounds et al., 1992; Maley et al., 1994; Smith et al., 1994; Yablonka y Rivera, 1994; Rantanen et al., 1995; Cornelison y Wold 1997; Cooper, 1999; Cornelison et al., 2000; Zammit et al., 2002).



Figura 6. Detalle de una célula satélite utilizando microscopía electrónica. Se observa la membrana basal alrededor de la célula satélite y la separación entre la fibra muscular y la célula satélite. Tomado de Muir et al., 1965.

3.2 Papel de los factores secretados durante la regeneración de músculo esquelético

El proceso de regeneración muscular requiere de la influencia de factores de crecimiento y una secuencia de eventos celulares, que resultan en la regulación de la población de células satélite (Hawke y Garry, 2001). Así, durante la regeneración muscular, los niveles de TGF- β y su receptor son expresados y resultan en la estimulación inicial de la proliferación celular seguida por la diferenciación muscular (Hawke y Garry, 2001).

Las heridas musculares causan liberación de moléculas biológicamente activas en el espacio extracelular que regulan la regeneración (Chargé y Rudnicki, 2004). En dicha regulación han sido implicados factores tróficos, como miembros de la familia del FGF y del TGF- β , IGF, HGF, TNF- α e IL-6 (Hubank y Schatz, 1994; Stamler y Meissner, 2001).

Además, los macrófagos modulan la fibrosis por medio de factores de crecimiento de varias maneras (Kovacs y DiPietro, 1994). Por ejemplo, el TGF- β y el PDGF pueden estimular directamente a los fibroblastos y la síntesis de colágeno. Los macrófagos también producen fibronectina, tromboespondina y otros proteoglicanos que son parte de la matriz extracelular (Jaffe *et al.*, 1985; Nathan, 1987).

3.2.1 LIF

La expresión de LIF en la lesión parece ubicua y se detectan transcritos de ARNm en células residentes no musculares como macrófagos y células de Schwann, así como en células musculares (Chargé y Rudnicki, 2004). También, estimula el crecimiento de mioblastos humanos y murinos *in vitro* a través de un mecanismo mediado por receptor sin afectar la diferenciación y fusión de los mioblastos (Austin y Burgess, 1991; Austin *et al.*, 1992; Bower *et al.*, 1995; Vakakis *et al.*, 1995; Spangenburg y Booth, 2002). Esta sustancia es producida por mioblastos y macrófagos (Hawke y Garry., 2001).

3.2.2 PDGF

El PDGF es una citoquina que produce una gran estimulación de la proliferación de las células satélite y fuerte inhibición de su diferenciación (Husmann *et al.*, 1996). En la regeneración, el PDGF se libera primero por parte de los vasos sanguíneos lesionados, las plaquetas y los macrófagos, es entonces que estimula la angiogénesis *in vivo* (Noble *et al.*, 1988). Se conoce que esta citoquina causa migración celular que incluye entre ellas a las células precursoras miogénicas (Ross *et al.*, 1986).

El PDGF se libera primero de plaquetas en desgranulación y luego de macrófagos (Husmann *et al.*, 1996). De esta manera se tiene que las plaquetas al desgranular liberan factores de crecimiento, como el PDFG y el TGF- β que son quimiotácticos para leucocitos y macrófagos, los que a su vez producen y secretan factores de crecimiento en el sitio de lesión (TGF- β , FGF-2, PDGF-AB y BB y LIF) lo que a su vez es quimiotáctico para las células precursoras miogénicas (Husmann *et al.*, 1996).

3.2.3 HGF

El HGF se aumenta durante la fase temprana de regeneración muscular y el incremento es proporcional al daño tisular (Tatsumi et al., 1998; Tatsumi et al., 2001; Suzuki et al., 2002).

También se ha probado que en extractos de músculo lesionado, el HGF es el factor primario que induce la activación de las células satélite quiescentes (Tatsumi et al., 1998), que comprende la estimulación de las células satélite *in vitro* para entrar en el ciclo celular y aumentar la proliferación de mpcs (Allen et al., 1995; Gal-Levi et al., 1998; Tatsumi et al., 1998; Miller et al., 2000). Su inyección en músculo lesionado bloquea la reparación muscular al tiempo que aumenta aproximadamente 3 veces la proliferación de mpcs, lo que confirma al HGF como mitógeno de células satélite *in vivo*, durante la fase inicial de la regeneración (Tatsumi et al., 1998; Miller et al., 2000). Por tanto, se dice entonces que el HGF es más importante en la fase temprana de la regeneración muscular, mientras que, no produce efectos sobre la regeneración en etapas posteriores (Tatsumi et al., 1998; Miller et al., 2000).

Entonces el HGF parece incrementar la población de mpcs por medio de actividades mitogénicas y quimiotácticas, posibilitando una densidad de mioblastos óptima sobre la cual la fusión puede comenzar (Chargé y Rudnicki, 2004).

3.2.4 FGF

El FGF estimula la migración de células endoteliales (Sato y Rifkin, 1988), así mismo, los niveles de expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) también han sido correlacionados con la eficiencia en la reparación en músculo esquelético de Balb/c y SJL/J (Anderson et al., 1995). *In vivo*, una fuente de FGF2 son los macrófagos de la reacción inflamatoria (Tidball, 1995) y otras son las células precursoras miogénicas (Silverstein et al., 1989).

El papel del FGF puede residir en la revascularización a través de sus reconocidas propiedades angiogénicas (Baird y Ling, 1987; Grounds, 1991; Chargé y Rudnicki, 2004). Se ha demostrado que ambos, tanto el FGF-1 como el FGF-2, *in vitro* e *in vivo* estimulan la proliferación y reprimen la diferenciación de mioblastos (Grounds et al., 1992). Según han demostrado algunos

investigadores parece ser que el mecanismo por el cual suprime la diferenciación de los mioblastos es a través de la inhibición de IGF II (Rosenthal et al., 1991).

Los FGF se almacenan en matriz extracelular, unidos al proteoglican heparan sulfato hasta que este sea utilizado localmente (Flaumenhaft et al., 1989). Las grandes cantidades de FGF que son liberadas en el pequeño periodo de inflamación, luego de la lesión del tejido pueden por un lado causar la quimiotaxis de otras células precursoras y por otro, inducir la proliferación de las primeras células satélite (Hussman et al., 1996).

Por lo tanto, se sugiere que la principal acción de los FGFs es la activación de la proliferación de células precursoras musculares, lo que provee suficientes células para que ocurra la regeneración muscular (Hussman et al., 1996).

3.2.5 IGF

Se divide en dos clases: IGF I y II. La IGF I estimula la proliferación de células satélites en rata (Dodson et al., 1985). El IGF II promueve tanto la proliferación como la diferenciación de mioblastos. (Ewton y Florini, 1980). Son producidas por las células satélites en músculo en regeneración y funciona de esta manera, como un factor trófico durante la regeneración (Jennische et al., 1987), que se debe a la activación de células satélite para su proliferación (Coleman et al., 1995; Adams y McCue, 1998; Barton-Davis et al., 1999; Musaro et al., 2001) y a la estimulación de la síntesis de proteínas en las fibras musculares existentes (Bark et al., 1998; Barton-Davis et al., 1999; Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999; Odelberg et al., 2000).

Se postula entonces que el IGF-1 funciona primero como mitógeno y más adelante promueve la diferenciación. Este último papel diferencia al IGF de los otros factores (FGF, PDGF) que son solo mitógenos durante la regeneración (Hussman et al., 1996).

3.2.6 TGF- β

Esta familia de citoquinas es moduladora de la actividad mioblástica, inhibiendo la proliferación y la diferenciación de las células precursoras miogénicas (Allen y Boxhorn, 1987; Allen y

Boxhorn, 1989; Greene y Allen, 1991; Lefaucheur y Sebille, 1995; Lefaucheur et al., 1996). La miostatina o factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8) es reconocido como un nuevo miembro de la familia del TGF- β que guarda similitudes con el TGF- β 1 (McPherron et al., 1997). También se ha visto que aumenta durante la fase temprana de la regeneración en donde ocurre la degeneración, e inhibe la proliferación de células satélite; también se puede sugerir que actúa como quimioatrayente para fagocitos y células inflamatorias, como sucede con la TGF- β 1 (Chargé y Rudnicki, 2004). Más tarde durante el proceso de regeneración, disminuye su cantidad ya que las células satélite activadas son más abundantes (Musaro et al., 1999).

El TGF- β 1, por otro lado, se libera por plaquetas que se desgranulan en el sitio de la herida y autoinducen su propia producción por células residentes, como células miogénicas de músculo liso. Se conoce que el TGF β -1 regula la quimiotaxis inflamatoria (Wahl et al, 1987) y en la regeneración, ejerce actividades quimiotácticas sobre macrófagos y leucocitos (Wahl et al., 1987), estimula la síntesis de fibronectina-colágeno, proteoglicanos y proteínas de matriz (Ignotz y Massague, 1986) además de inducir angiogénesis (Roberts et al. 1986). También se mostró que el TGF- β aumenta la densidad vascular en tumores y la infiltración de macrófagos, y que su inhibición reduce la vascularización tumoral (Tuxhorn et al., 2002).

Así mismo, el TGF- β también es quimioatrayente para monocitos que son potentes inductores de angiogénesis al secretar, FGF, TNF y IL-1 (Wahl et al., 1987; Wisemann et al., 1988). Así mismo, los fibroblastos también son atraídos por el TGF- β , y aumentan la síntesis de proteínas de matriz (Roberts y McGeachie, 1990). De esta manera parece que ayuda a reconstruir la membrana basal y la matriz extracelular alrededor de las miofibras dañadas y de las células satélite activadas (Edwards et al., 1987; Streuli et al., 1993). Así mismo, la matriz extracelular regula la expresión del TGF- β (Streuli et al., 1993) y el TGF- β a su vez estimula la producción de PDGF (Hamilton, 1990). Sin embargo se ha propuesto, que una excesiva deposición de matriz extracelular inducida por el TGF- β puede generar fibrosis (Border y Ruoslahti, 1992). Además, *in vivo* se observa una ligera supresión de la proliferación de mioblastos pero una potente inhibición de su diferenciación (Olson et al., 1986; Allen y Boxhorn, 1989).

3.2.6.1 Efecto de la inhibición de FGF, IGF y TGF β -1

En experimentos realizados por medio de denervación/desvascularización de músculo esquelético, la inhibición de FGF e IGF al día sexto luego de lesión, reduce el número de miofibrillas en regeneración y el número de fibrillas sobrevivientes así como el diámetro promedio de la miofibrilla se va reduciendo significativamente (Lefaucheur y Seville, 1995). A los 11 días, el panorama es diferente ya que la neutralización de bFGF da resultados similares a los del control, es decir, la inhibición de bFGF no reduce la regeneración de manera observable, mientras que, la inhibición del IGF-I produjo una disminución significativa de esos valores y la inhibición de TGF β -1 produce un aumento de manera significativa de esos valores (Lefaucheur y Seville, 1995).

3.2.7 TNF- α

El TNF- α , es una citoquina proinflamatoria producida por los macrófagos activados, que tiene un rol importante en la reparación muscular (Li, 2003). Existen datos que sugieren que el TNF- α activa células satélite para entrar en el ciclo celular y acelera la transición de G1 a S (Li, 2003). Además de los macrófagos, los miocitos también son fuente de TNF- α ya que estos le sintetizan constitutivamente (Li, 2003).

Así mismo, el TNF- α causa un retraso en la salida del ciclo celular de los mioblastos (Langen et al., 2004), esto es, inhibe la diferenciación miogénica a través de la desestabilización de proteína MyoD de manera NF- κ β dependiente (Langen et al., 2004). El MyoD pertenece a los factores reguladores musculares (junto con Myf5, miogenina y MRF4), una familia de factores de transcripción (Langen et al., 2004). Por lo tanto, el MyoD es reconocido como la clave en la regulación de la diferenciación miogénica (Cornelison et al., 2000).

Durante la lesión muscular, el TNF- α no solo se libera en grandes cantidades por macrófagos que infiltran sino que se sintetiza en niveles aumentados por las fibras musculares lesionadas (Li, 2003). Así, en la regeneración, el TNF- α es capaz de activar células satélite para entrar en el ciclo celular desde su estado normal quiescente (Li, 2003).

Es importante rescatar que la mayoría de los factores de crecimiento estimulan la proliferación de células satélite e inhiben su diferenciación. Esto con excepción de los IGFs que logran la proliferación y la diferenciación durante la regeneración muscular (Husmann et al., 1996).

4. Papel de la vasculatura en la regeneración del músculo esquelético.

La estabilidad de la microvasculatura es importante porque asegura la provisión de macrófagos, importantes para el aclaramiento de restos musculares, la presentación de factores reguladores, de factores de crecimiento y la entrega de oxígeno para sostener la intensa fase de regeneración metabólica (Harris, 2003).

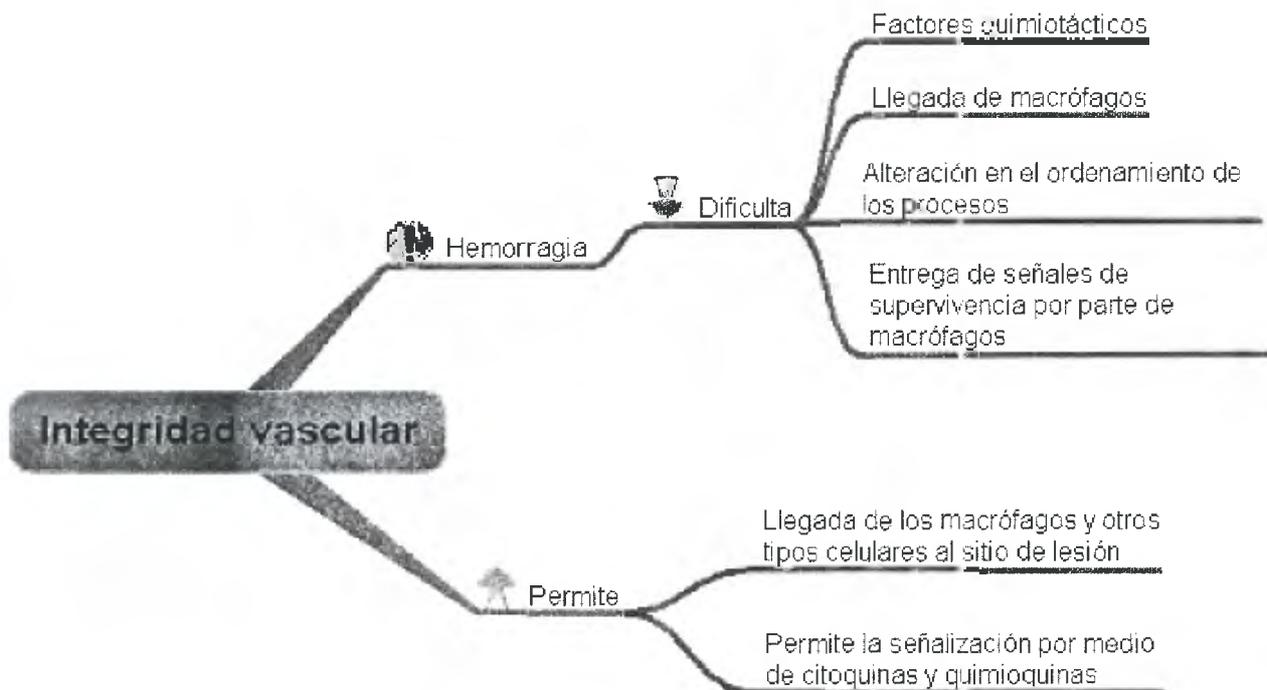


Figura 7. Relevancia de la integridad vascular en la regeneración de tejido muscular.

5. Regeneración del músculo esquelético dañado por una toxina mionecrótica.

Luego de la inyección de notexina, las células satélite migran y forman cadenas longitudinales de células ordenadas en el tubo de la lámina basal. La fusión de esas células, tiende en última instancia a la formación de nuevas fibras musculares multinucleadas (Snow, 1977). Con la

administración de notexina, las células satélite se activan entre las 6-12 horas luego de iniciado el daño por las toxinas (Grounds et al., 1992; Vater et al., 1994) y esa lesión, en el caso de la notexina, resulta en una gran respuesta inflamatoria, lo que puede ser un importante factor en la activación de células satélite (Lefaucheur y Seville, 1995). De la misma manera, se ha observado que las células satélite localizadas cerca de un área de inflamación, se activaban de una manera más marcada que las que no se encuentran próximas a un área inflamada (Klein-Ogus y Harris, 1983).

6. Comparación entre los efectos de una toxina mionecrótica y un procedimiento que interrumpe la vascularización de músculo esquelético

En experimentos realizados por Lefaucheur y Seville (1995) utilizando la metodología de denervación/desvascularización (D/D), encontraron un escaso infiltrado de células inflamatorias que fue observado hasta los 11 días. Los macrófagos representaban el mayor subtipo de esas células, según fue mostrado por la tinción con fosfatasa ácida y la citometría con anti-F4/80. Por el día 2-4 luego de la lesión, se presentaron miofibras en necrosis. Por otro lado, la fagocitosis alcanzó su punto máximo para el día 3-4 y no se observó más desde el día 6, mientras que durante el día quinto se observaron las primeras fibras regenerativas (Lefaucheur y Seville, 1995).

Por otra parte, la degeneración/regeneración muscular seguida de la inyección con notexina tomó lugar más rápidamente que en la D/D. Unas cuantas horas posteriores a la lesión, se observó un extenso infiltrado inflamatorio, principalmente de macrófagos, que se mantuvo por 2 días. Desde el día 1, muchas miofibrillas exhibían un patrón necrótico y ya sufrían fagocitosis. Para el día 2, ese aspecto se había extendido por todo el músculo y pocas fibrillas sobrevivieron a la acción tóxica de la notexina, las cuales se encontraban dispersas principalmente en la periferia. Las fibras necróticas no se observaron sobre el día 3, mientras que algunas fibras degeneradas calcificaron. La células musculares en regeneración que se encontraron más temprano en la lesión, fue al día 3 (Lefaucheur y Seville, 1995).

Además, estudios *in vitro* muestran como las células satélite quiescentes resisten drogas mitotóxicas como marcaina o los venenos de serpientes. Por otro lado, las células satélites no sobreviven en zonas diseminadas de isquemia en músculos transplantados. Las células satélites tampoco sobreviven en la zona de denervación-desvascularización (DD), por lo que, la mejor resistencia en la periferia se atribuye a que la regeneración sigue un patrón centrípeto por lo que los efectos regenerativos suceden primero en la periferia (Lefaucheur y Seville, 1995).

Por lo tanto, las células satélites resisten mejor la acción de venenos a sustancias mitotóxicas que la isquemia, ya que las mpcs no soportan la isquemia, pero sí son particularmente resistentes a la acción de las toxinas (Lefaucheur y Seville, 1995).

Estudios recientes ya señalan la implicación del macrófago en la plasticidad muscular (Pimorady-Esfahani et al., 1997). El macrófago tiene un rol importante en el proceso de regeneración muscular y varios estudios han demostrado que los macrófagos son capaces de liberar factores angiogénicos y tróficos (Gimbrome, 1984; Nathan, 1987), estimulan la proliferación y diferenciación de precursores musculares en cultivo primario y ejercen un efecto quimiotáctico en células miogénicas (Robertson et al., 1993). Por lo tanto, los macrófagos no solo actúan como células fagocíticas, sino que producen gran variedad de factores involucrados en la proliferación y diferenciación por ejemplo de fibroblastos productores de matriz (Razzaque et al., 2005). Como se había mencionado anteriormente, los macrófagos son el tipo celular predominante dentro de las áreas de lesión alrededor de 48 a 72 horas posteriores al insulto. Al finalizar el primer mes, la herida generalmente se encuentra sana y presenta tejido de cicatrización cubierto por epitelio. Sin embargo, en heridas de gravedad, puede existir lo que se conoce como regeneración de segunda intención, que es un proceso dinámico acompañado de respuestas inflamatorias intensificadas y formación de tejido de granulación (Razzaque et al., 2005), se entiende que el proceso es más crónico que el que se detalla primero.

Se ha observado que la regeneración muscular nunca precede a la infiltración de MO/MP, pero ésta se desarrolla concomitante con la progresión de macrófagos, que proceden de la periferia hacia el centro (Lescaudron et al., 1999). En experimentos por medio de trasplantes de músculo esquelético (modelo de desvascularización/denervación), los macrófagos son visibles en el tejido a los 2 días luego del trasplante. Además, se ha observado que la infiltración de macrófagos en el trasplante procedió de la periferia al centro, del tercer día en adelante (Lescaudron et al., 1999).

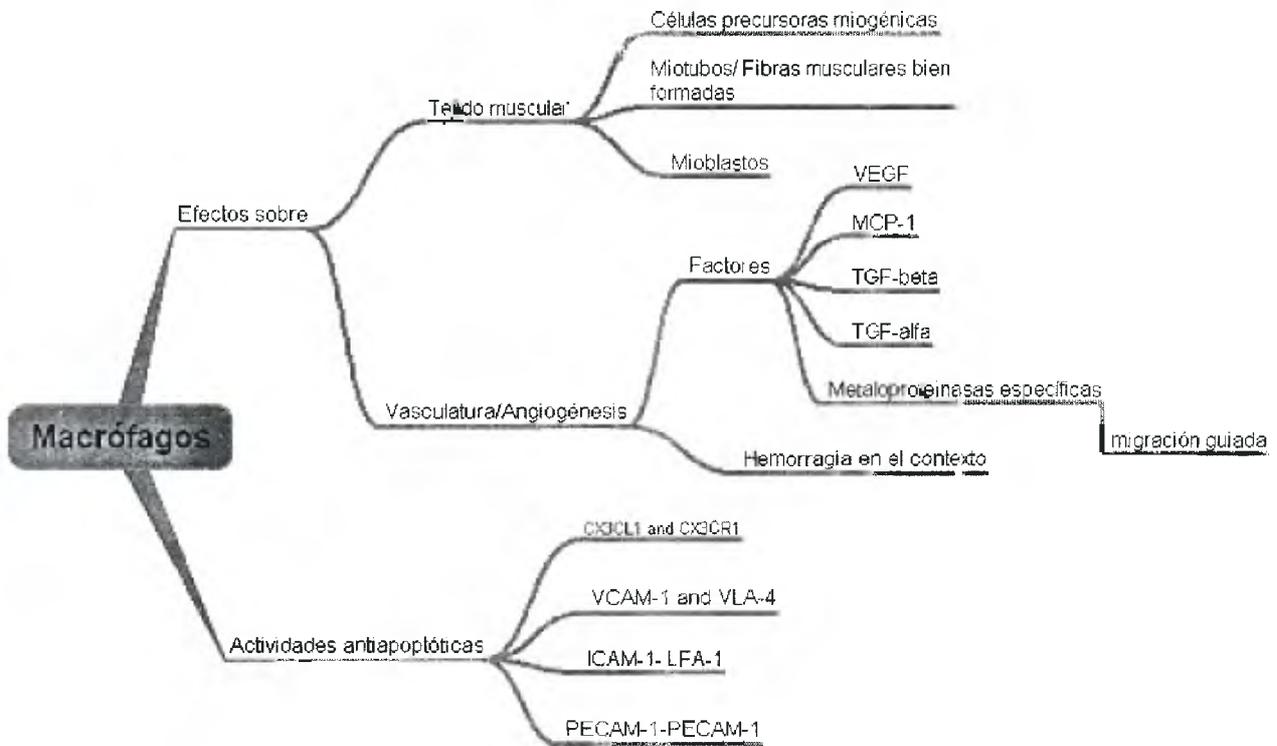


Figura 8. Funciones del macrófago dentro de la regeneración muscular.

1.1 El macrófago como célula estromal

Las células estromales son células definidas por su habilidad para respaldar el desarrollo, mantenimiento, proliferación y diferenciación de tipos celulares tejido específicos. (Muller-Sieburg y Deryunira, 1995)

Dentro de las células estromales, los macrófagos juegan un papel primordial en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Sus funciones además de comprender fagocitosis y presentación de antígenos, incluyen el sostén a través de moléculas de membrana plasmática y secretadas (Gordon, 1995). De manera que el daño muscular induce infiltración masiva del macrófago al sitio de lesión. Así mismo, macrófagos reclutados remueven activamente los restos necróticos y facilitan la regeneración muscular subsecuente (McLennan, 1996; Pimorady-Esfahani et al., 1997). Además, cuando los neutrófilos entran en la herida, poco tiempo después se vuelven apoptóticos y seguidamente, los macrófagos son los encargados de remover a esos neutrófilos en apoptosis así como los restos celulares de la lesión (Leibovich and Ross, 1975).

Por lo tanto, es importante anotar que alteraciones en la población de macrófagos pueden resultar en regeneración anormal del tejido acompañada de pobre debridación (Razzaque et al., 2005).

2. Citoquinas producidas por los macrófagos relacionadas con la regeneración muscular

Los macrófagos secretan numerosas citoquinas que actúan como agentes activadores de la regeneración (Cantini et al. 2002). Los mediadores liberados por los macrófagos que infiltran los tejidos son capaces de estimular la proliferación y diferenciación de células precursoras miogénicas (Li, 2003).

3. Factores que regulan la quimiotaxis de los macrófagos

Se ha mostrado que el macerado de músculo esquelético de ratón produce la quimiotaxis de macrófagos peritoneales (Robertson et al., 1993).

En cultivos, se ha observado como mpcs humanos atraen células mononucleares periféricas desde la circulación. En experimentos realizados por Chazaud et al., (2003), la actividad quimiotáctica ejercida por las mpcs en cultivo celular fue alta a los 3 días y se redujo a los 7 días, luego de los cuales continuó declinando en estados subsecuentes de diferenciación. La quimiotaxis ejercida por mpcs se redujo en un 42% del día 3 al 7 y del día 7 al 14 está declinó un 18%, lo que confirma que las mpcs exhiben su actividad individual quimiotáctica máxima poco después de liberarse de su estado quiescente (Chazaud et al., 2003). Así mismo, la actividad quimiotáctica de las mpcs cultivadas en un medio que induce su diferenciación a miotubos tuvo la caída más abrupta. Lo anterior confirma que la diferenciación está asociada a una caída de la actividad quimiotáctica. También se apunta que la quimiotaxis ejercida sobre los MPs es dependiente de la magnitud del gradiente de citoquinas que se genere (Chazaud et al., 2003).

Por medio de arreglos de ADN, se localizaron 5 productos conocidos por ser quimiotácticos para monocitos que eran expresados sobre el día 7 y 14 de cultivo de mpcs y son los siguientes (Chazaud et al., 2003):

1. MPC-1
2. MDC
3. FKN
4. VEGF
5. uPAR

Por lo anterior, es que en el estudio se dice que MCP-1, MDC, FKN y VEGF y el sistema uPAR/uPA son los principales efectores de la quimiotaxis de monocitos ejercida por mpcs (Chazaud et al., 2003).

Ensayos de inhibición realizados en el día 14 (que es donde se muestra la actividad global más alta, no así la actividad individual) mostraron una importante redundancia de los mecanismos por los cuales actúan las quimioquinas que se mencionaron anteriormente.

Cuadro 1. Disminución de la quimiotaxis frente a la inhibición de diferentes citoquinas en modelo experimental.

Quimiocina inhibida	Decremento de quimiotaxis
MCP-1 (citoquina)	45%
MDC (citoquina)	50%
FKN (citoquina)	62%
VEGF (factor de crecimiento)	44%
uPAR (sistema proteolítico)	26%

La utilización de una combinación de anticuerpos contra MCP-1, MDC, FKN y VEGF y el sistema uPAR/uPA produjo una inhibición de 77% en la quimiotaxis de los monocitos (Chazaud et al., 2003). Este comportamiento se basa, en la observación de que los macrófagos integran las señales que reciben de manera promiscua utilizando múltiples receptores (Foxman et al., 1999).

Al comparar cultivos de mpcs clásicos (donde sólo se utiliza medio de cultivo) y cultivos de mpcs condicionados por macrófagos, se observa un incremento del efecto quimiotáctico sobre los monocitos de un 31%. La inhibición de ese condicionamiento por parte de los macrófagos produce un decremento de 67% de la actividad quimiotáctica. Sin embargo, macrófagos cultivados en medio condicionado por mpcs aumentaron su quimiotaxis en un 94% (Chazaud et al., 2003). Así mismo, en cocultivos de MPs con mpcs se observó que se produce un aumento de la densidad de mpcs que es dosis dependiente. Dicho aumento es aún más pronunciado cuando se permite el contacto entre las células, en comparación con un cultivo en el que dicho acercamiento no se permite, gracias a la utilización de una membrana porosa.

Por lo que se ha determinado, que los macrófagos promueven la proliferación de mpcs por factores solubles y la supervivencia por contactos directos (se explica más adelante) (Chazaud et al., 2003). También se ha observado que a los cultivos de mpcs que se les agrega medio condicionado por MPs, que contiene los factores secretados por los macrófagos en medio de cultivo pero que no contiene macrófagos, no se ve aumentada la supervivencia, por lo que no se trata entonces de factores solubles (Chazaud et al., 2003).

Los experimentos realizados por Chazaud et al. (2003) muestran que las mpcs pueden atraer monocitos a través de la capa endotelial. De manera específica y selectiva en forma dosis dependiente (Chazaud et al., 2003).

4. Efecto antiapoptótico de los macrófagos sobre miotubos y mioblastos

Los macrófagos liberan factores de crecimiento mitogénicos para células precursoras miogénicas y establecen interacciones célula-célula que las protegen de apoptosis (Arnold et al., 2007). Observaciones realizadas por Chazaud et al. (2003) muestran como el efecto antiapoptótico ejercido por los MPs es más pronunciado en los miotubos que en los mioblastos al inducirlos a apoptosis por medio de taurosporina (STS). Los MPs lograron disminuir la actividad de la caspasa 3 en ambos tipos celulares con efecto mayor en los miotubos (Sonnet et al., 2006).

El efecto antiapoptótico de los macrófagos se asocia a la activación de señales de supervivencia. La expresión de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) es importante para la supervivencia de células miogénicas en expansión. Entonces, el efecto protector de los MPs se observa de manera más pronunciada en los miotubos, en vista de que ellos se encuentran en mayor riesgo de entrar en apoptosis ya que tienen una pobre expresión de Bcl-2. Además, solo un pequeño porcentaje de células miogénicas expresan Bcl-2 y esas células Bcl-2 positivas resisten apoptosis y se encuentran en una fase temprana del proceso que lleva a la formación de miotubos a partir de las células precursoras miogénicas. En ratones knock-out para Bcl-2, los miotubos se forman normalmente, sin embargo las colonias musculares producidas por clonación de células Bcl-2 null sólo contienen la mitad de las células que tienen las colonias que produce el fenotipo silvestre del ratón (*wild type*). El resultado anterior sugiere que, durante la expansión clonal de las células precursoras miogénicas, la progenie obtenida, en número, es mayor cuando Bcl-2 está presente (Dominov et al., 1998).

En cocultivos de células precursoras miogénicas y macrófagos se observa un aumento significativo de Bcl-2 respecto a cultivos de células precursoras miogénicas y de macrófagos por separado. Este y otros resultados sugieren que los macrófagos inducen señales de supervivencia y disminuyen la apoptosis de células precursoras miogénicas *in vitro* (Sonnet et al., 2006).

Cuatro sistemas antiapoptóticos (CX3CL1 and CX3CR1, VCAM-1 and VLA-4, ICAM-1- LFA-1, PECAM-1-PECAM-1) median el efecto antiapoptótico que los macrófagos ejercen sobre las células precursoras miogénicas. Al inhibir cada uno de esos sistemas, se eliminaron los efectos positivos que ejercen los MPs sobre las mpcs. Así mismo, el influjo de MPs en músculo inyectado con notexina (*in vivo*) y la desaparición de células apoptóticas en el tejido es sincrónico. Al avanzar el influjo de los macrófagos en el tejido, la presencia de células precursoras miogénicas apoptóticas disminuye drásticamente. A las 48 horas luego del envenenamiento la infiltración con macrófagos es masiva y la presencia de mpcs apoptóticas es sumamente escasa. En ese momento los efectores (CX3CL1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1), y sus receptores (CX3CR1, VLA-4, LFA-1, PECAM-1) se expresaron en mpcs y MPs respectivamente (Sonnet et al., 2006).

5. Papel de los macrófagos en angiogénesis

El hallazgo de células positivas para el marcador CD45 en el frente de avance de capilares en formación en embrión de ratón, por ejemplo, sugieren el papel de los macrófagos en angiogénesis. La presencia de MO/MP fue considerada hasta hace un tiempo como sólo pertinente a la liberación de factores reguladores del proceso de angiogénesis por parte de los mismos. Sin embargo, se ha observado que los macrófagos ejercen actividades mecánicas y estructurales durante la formación de capilares (Moldovan y Moldovan, 2005).

Durante la estimulación del crecimiento capilar, los macrófagos producen mediadores in situ, que incluyen a IL-1, TGF α , TGF β , PDGF, EGF (factor de crecimiento epidermal), quimiokinas CXC, VEGF e IGF-1 (factor de crecimiento insulínico) (DiPietro y Strieter, 2002). El FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) son dos de los factores de crecimiento que ejercen efectos angiogénicos en las células endoteliales y la neovascularización subsecuente, éstos y otros factores serán analizados con detalle más adelante (Razzaque et al., 2005).

Cuadro 2. Productos de los macrófagos que influyen la angiogénesis. Tomado de DiPietro y Strieter, 2002.

- 1 Positive mediators
 - Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)
 - Transforming growth factor- α (TGF- α)
 - Basic fibroblast growth factor (FGF-2)
 - Angiotropin
 - Platelet-derived growth factor (PDGF)
 - Platelet-derived growth factor-like compounds
 - Vascular endothelial growth factor (VEGF)
 - Interleukin-6 (IL-6)
 - Prostaglandins
 - ELR⁺ CXC chemokines (e.g. IL-8 and ENA-78)
 - Interleukin-10 (IL-10)
 - 2 Mediators that have been observed to be both positive and negative
 - Tumor necrosis factor- α (TNF- α)
 - Interleukin-1(IL-1)
 - Transforming growth factor- β (TGF- β)
 - 3 Negative mediators
 - Interferon- α , interferon- γ
 - Thrombospondin 1 (TSP1)
 - Interferon-inducible ELR⁻ CXC chemokines (e.g. IP-10 and MIG)
-

5.1 Efecto quimiotáctico sobre macrófagos y angiogénico de VEGF

El VEGF es uno de los factores proangiogénicos más importantes (también se conoce como Factor de permeabilidad vascular), el cual promueve la migración y proliferación de las células endoteliales y permeabilidad vascular aumentada, que también contribuyen con la angiogénesis. Se creía que la función de la VEGF estaba restringida a las células endoteliales. Sin embargo, se ha visto que los macrófagos expresan VEGFR-1 y responden de diversas maneras a la exposición de VEGF (Clauss et al., 1990).

En escenarios fisiológicos y patológicos con condiciones locales, como la hipoxia o la concentración de lactato, las células endoteliales y los macrófagos son atraídos y activados (Razzaque et al., 2005). Por ejemplo, la hipoxia induce la producción de VEGF por parte de los macrófagos, de manera que el ambiente de hipoxia generado por la lesión puede ser importante en la expresión local de VEGF (Shweiki *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 1998). Así mismo, el VEGF sintetizado y bioactivo es regulado por los niveles de lactato (Zabel *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 1998). En condiciones de hipoxia, los niveles altos de lactato, pueden inducir la producción de la actividad angiogénica de los macrófagos. De esta forma, el macrófago responde a los niveles de lactato y a la hipoxia y genera factores proangiogénicos hasta que el oxígeno tisular y el lactato

regresan a la normalidad (DiPietro y Strieter, 2002). Por otra parte, existen otros inductores de la producción de VEGF por parte de los MO/MP, por ejemplo la relaxina, el lipopolisacárido y las prostaglandinas (Moldovan y Moldovan., 2005).

La importancia del rol que tienen los macrófagos en el proceso angiogénico se podría inferir al observar que las células endoteliales y los macrófagos comparten receptores funcionales para VEGF. Lo anterior en vista de que una cantidad importante de macrófagos en sangre periférica expresan Flt-1 en la superficie celular, el cual está implicado en la respuesta quimiotáctica inducida por VEGF (Sawano et al., 2001). El significado que tiene esto reside en que el VEGF tiene implicaciones no sólo en angiogénesis, sino también en la infiltración de macrófagos.

5.2 Efecto quimiotáctico sobre macrófagos y angiogénico del MCP-1

Cuando se expone a las células endoteliales a VEGF o a isquemia breve, estas sintetizan MCP-1 (Marumo et al., 1999).

Es interesante señalar que el MCP-1 si bien es importante para la angiogénesis y la regeneración del tejido por parte de los macrófagos (lo cual se probó con ratones deficientes de MCP-1) la ausencia de MCP-1 produjo una lenta angiogénesis y regeneración pero el número de macrófagos infiltrando tejido no cambió, lo que sugiere que el efecto sobre los macrófagos no es aumentar su número en el tejido sino influenciar el estado efector del macrófago. Se mostró que el TGF- α es angiogénico *in vivo* (Schreiber et al., 1986).

Cabe resaltar que los macrófagos son células que producen citoquinas y demás factores de crecimiento en relación con el ambiente en que se encuentren. Así, en humanos los macrófagos en cultivo celular secretan TNF- α e IL-1 β si son estimulados con LPS/IFN γ , mientras que el tratamiento con dexametasona/IL-10 induce la secreción de IL-10 (Arnold, 2007).

En experimentos utilizando el procedimiento de DD, ambos, MIP 1 β y VEGF utilizados solos o en combinación, aumentaron la infiltración de MO/MP en el trasplante. Además, ambos factores aceleraron la regeneración en el trasplante. (Lescaudron et al., 1999). Desde los 3 días se vieron células satélite activadas en el trasplante en los que fueron tratados con VEGF y MCP1. Sin

embargo, a las 24 horas, los músculos tratados con MCP-1 no aumentó más la regeneración y esta se volvió comparable a la observada en el control. Por el contrario, sólo los músculos tratados con VEGF continuaron regenerando el tejido de manera significativa (Lescaudron et al., 1999).

Al tercer y cuarto día, luego de la implantación, el factor quimiotáctico MCP-1 no tuvo efecto en la formación de miotubos. Mientras, el tratamiento con VEGF produjo un efecto significativo en el número de miotubos en regeneración de aproximadamente 6 veces (Lescaudron et al., 1999).

5.3 Papel de las enzimas degradativas de la matriz de los macrófagos en la angiogénesis

Los macrófagos también producen degradadores de matriz extracelular en la herida como son las metaloproteinasas, activadores de proteinasas e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (Fukasawa *et al.*, 1989; Welgus *et al.*, 1990; Porras-Reyes, 1991; Falcone *et al.*, 1993). Los estudios sugieren que el macrófago es un participante activo en el remodelado de la matriz extracelular. Es importante recalcar que la proliferación de células endoteliales, la migración y la formación capilar, son dependientes de la composición de la matriz extracelular, de manera que la influencia de los macrófagos en dicha matriz extracelular es crítica para la angiogénesis (DiPietro y Strieter, 2002).

Para formar nuevos capilares, las células endoteliales necesitan migrar. Como el tejido opone resistencia mecánica, las células deben de generar un camino al degradar matriz extracelular (MEC). MEC contiene la membrana basal y el estroma intersticial y tiene una estructura molecular compleja. Se sugiere por tanto que en fases más tardías de la angiogénesis, luego de que las colagenasas más comunes han ejercido su efecto, los macrófagos liberan las metaloproteinasas específicas. De esta manera el macrófago se encuentra activo y presente durante la penetración de la MEC por los capilares (Madlener et al., 1998).

5.4 Cooperación intercelular

En modelos *ex vivo* de crecimiento capilar de vasos adultos en matrices de fibrina se mostró que la habilidad de las células endoteliales de insertarse entre células endoteliales cercanas dependía

de la existencia de un lumen capilar, aunque sea inmaduro. Al proceso se le llamó migración guiada (Nehls et al., 1998).

Durante la infiltración de tejidos, los macrófagos penetran a la matriz extracelular activamente, por lo que se sugiere que en ciertas condiciones, el primer paso para la formación de capilares que es la excavación de un túnel, puede ser ejecutado por un macrófago además o en vez de una célula endotelial (Anghelina et al., 2002).

Por tanto, se apunta hacia una hipótesis que sugiere la cooperación de los MO/MP por su actividad fagocítica y penetrante con la proliferación y colonización del tejido por células endoteliales, que al final resulta en angiogénesis (Moldovan, 2002).

6. Subtipos de macrófagos en la regeneración muscular esquelética

6.1 Separación fenotípica de los macrófagos en subtipos

En adelante se analiza el cambio fenotípico de monocitos en el tejido durante la regeneración muscular esquelética según las observaciones de Geissmann et al. (2003).

Los monocitos se definen como células mononucleares sanguíneas con núcleo en forma de frijol, expresión de CD11b, CD 11c y CD14 en humanos y CD11b y F4/80 en ratón, y ausencia de marcadores B, T, NK y DC (Muller 2001). Existen dos subtipos distintos de esos monocitos en sangre de ratón diferenciables por su expresión de CX3CR1 (Geissmann et al., 2003).

Las células CX3CR1^{lo} son células mononucleares de 10-14 μm de diámetro. Mientras que las células CX3CR1^{hi}, células más pequeñas mononucleares con diámetro de 8-12 μm (Geissmann et al., 2003). Además, las poblaciones de monocitos expresan las siguientes moléculas de adhesión de manera diferencial. Por ejemplo, las células CX3CR1^{lo} expresan CD62L (L selectina) Ly6C/G (GR1), $\alpha 2$ y $\alpha 4$, integrina (VLA2 y VLA4), LFA1 y CCR2; mientras que monocitos CX3CR1^{hi} solo expresan LFA1 y VLA4 (Geissmann et al., 2003).

En humanos hay 2 subtipos de monocitos análogos a los presentes en ratón. Los de ratón CX3CR1^{hi} son similares a los CD16+ en humanos. Los CX3CR1^{lo} corresponden a los CD14+.

Se ha demostrado que los macrófagos derivados de monocitos aumentan el crecimiento celular (Geissmann et al., 2003).

El criterio para diferenciar monocitos de otros tipos de leucocitos es su mononuclearidad, que se entiende como su separación ortogonal, que en este caso es baja. La separación ortogonal es la que permite poder diferenciar elementos granulares dentro de la célula, su naturaleza micloide indicada por niveles altos de expresión de CD11b-Mac.1. Alta actividad fagocítica y la capacidad de desarrollarse en macrófagos (Geissmann et al., 2003).

De particular importancia es el Ly6C (ER/MP20), que es marcador de membrana diferencial para los subtipos de monocitos que se encuentran en sangre, esto es, los Ly6C^{hi} y los Ly6C^{lo}. Los monocitos Ly6C^{hi} presentan ese marcador de membrana en una mayor cantidad y son inmigrantes de médula ósea, que tienen la capacidad de migrar a sitios de inflamación periférica. En contraste con Ly6C^{lo} que presentan el marcador de membrana en menor cantidad y han perdido el potencial de expresar ese receptor (Geissmann et al., 2003).

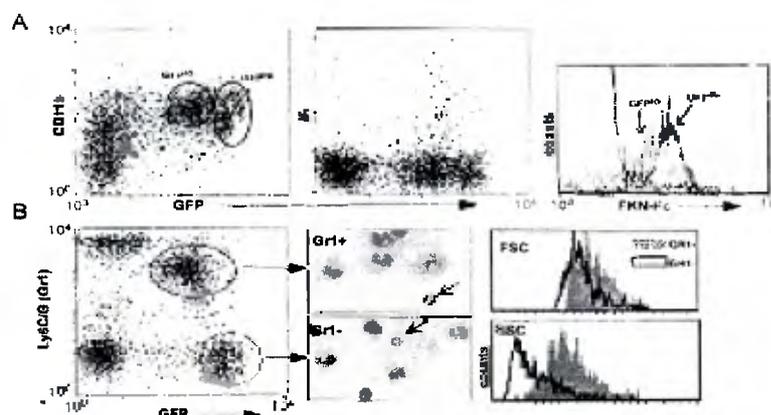


Figure 1. Definition of Mouse Monocyte Subsets by CX3CR1 Expression.
 (A) Blood mononuclear cells from *CX3CR1^{fl/fl}RAG^{fl/fl}* mice were stained for CD11b and EA (left and middle panels) and FKN-Fc (right panel). Binding of FKN-Fc is shown for gated populations of GFP⁺ cells (gray histogram) and GFP⁻ cells (black histogram).
 (B) Blood mononuclear cells from *CX3CR1^{fl/fl}RAG^{fl/fl}* mice were stained for Ly6C/Gr1 and sorted, according to the indicated gates, for microscopic analysis (middle panels). The arrows indicate red blood cells of 7 μ m diameter. The forward and side right scatter profiles of Gr1⁺GFP⁺ (open histograms), and Gr1⁻GFP⁺ (shaded histograms) cells are shown in the panels at right.

Figura 9. Patrones observados en citometría de flujo utilizados para separar los dos subtipos de monocitos presentes en sangre. Tomado de Geissmann et al., 2003.

Cuadro 3. Equivalentes de los subtipos celulares observados en tres especies diferentes.

Animal	Fenotipo inflamatorio	Fenotipo regenerativo

Humano	CD14 ^{hi} /CD16-	CD14 ^{lo} /CD16+
Ratón	CX3CR1 ^{lo} /Ly-6C ^{hi}	CX3CR1 ^{hi} /Ly-6C ^{lo}
Rata	ED1+	ED2+

Los SSC^{lo} CD11b^{hi} son negativos para marcadores T (CD3) y B (CD19) y NK (NK 1.1) pero son positivas por M-CSF R (Geissmann et al., 2003).

El crecimiento del subtipo de MO Ly6C^{hi} en medio con M-CSF fue mayor que el observado para MO/MP Ly6C⁻. Todos los subtipos proliferaron pero los que más capacidad proliferativa mostraban eran los Ly6C⁺ (Geissmann et al., 2003).

Los monocitos entran a la circulación desde la médula ósea como MOLy6C^{hi} y se convierten en la circulación en MOLy6C^{lo} antes de emigrar a tejidos periféricos. Estudios *in vitro* sugieren que luego de que un monocito Ly6C⁺ entra a circulación, pasan de 24 -48 horas para que regule la disminución del marcador Ly6C y que se convierta en Ly6C⁻ (Geissmann et al., 2003).

Estudios han comprobado que los monocitos reclutados a sitios de inflamación periférica típicamente muestran una elevada expresión de Ly6C (Geissmann et al., 2003).

Se ha encontrado que los subtipo de monocitos representan diferentes etapas en una vía continua de maduración (Geissmann, 2003). Esto es, que el subtipo Ly6C⁺ evoluciona en el subtipo Ly6C⁻, como se verá a continuación.

Cuadro 4. Fenotipo de los dos subtipos de monocitos que se encuentran en sangre. Tomado de Geissmann et al., 2003.

Table 1. Phenotype of Mouse Monocyte Subsets

	Subset 1 (Inflammatory)	Subset 2 (Resident)
Monocyte marker		
CD11b	+	+
F4/80	+	+
Ly6C/G	+	-
Chemokine receptors		
CX3CR1	lo	hi
CCR2	+	-
Adhesion molecules		
CD31	++	+
LFA1	+	++
VLA1	-	-
VLA2	+	-
VLA4	+	+
L-selectin (CD62L)	+	-
Miscellaneous		
CD16/32	+	+
CD44	+	+
CD45	+	+
CD45 RA, RB, RC	-	-
Ki67	-	-
T, B, NK, IPC, DC markers		
CD80	-	-
B220 (CD45R)	-	-
TCR β	-	-
CD11c	-	-
IA	- (<5%)	-
NK1.1	-	-

6.2 Cinética de los subtipos de macrófagos durante la regeneración muscular

Luego del daño muscular, los monocitos Ly6C⁺ son reclutados de sangre y se convierten en MO/MP antiinflamatorios Ly6C⁻ MO/MP que proliferan *in situ* y más tarde se diferencian en macrófagos maduros (Arnold, 2007). La fagocitosis de células musculares degeneradas o necrosadas (debris) participa en esa transición fenotípica de los macrófagos de Ly6C⁺ a Ly6C⁻ (Arnold, 2007). Cabe destacar que los macrófagos llamados residentes no fagocitan material dañado sino que atraen macrófagos al sitio de lesión (McLennan, 1993).

A - Kinetics of MO/MP subsets during muscle regeneration

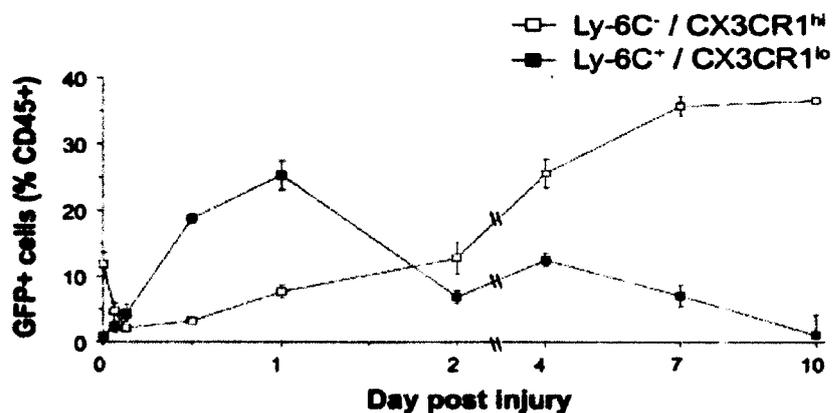


Figura 10. Cantidades diferenciales de los dos subtipos de MO/MP en diferentes tiempos, luego de la administración de notexina. Tomado de Geissmann et al., 2003.

Se ha observado también que los MO/MP se presentan secuencialmente durante esta regeneración muscular. Es importante anotar que el músculo normal contiene pocas células CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ (aproximadamente 200 células/mg de músculo) (Arnold et al., 2007). Se ha observado también que, cuando se induce inflamación con notexina ya desde los 90 minutos posterior a la inyección de la toxina se observan MO/MP CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ en músculo que invaden el tejido y alcanzan un punto máximo 24 horas luego de la lesión (Arnold et al., 2007). Dicha población de CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ declina rápidamente mientras que la de CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ se mantiene y alcanza una meseta a los 7 días (Arnold et al., 2007). Entre el día 1 y 4 posterior a la lesión se ha notado un aumento de los macrófagos CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ de 20 veces contra un incremento de 2 veces de los CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ (Arnold et al., 2007).

Se ha observado también que los monocitos Ly6C⁺ son reclutados rápidamente por el tejido lesionado. Es importante recalcar que la MCP-1 es la quimioquina que estuvo más relacionada con el reclutamiento de macrófagos por parte del músculo. En experimentos de depleción de macrófagos llevados a cabo por Arnold et al. (2007) no hubo más reclutamiento de macrófagos luego de la depleción transitoria de macrófagos durante las 0 a las 24 horas luego de la lesión muscular aún cuando el pool de monocitos ya se había reconstituido. Lo que sugería que el fenotipo CX3CR1^{lo}/Ly-6C⁺ MO/MP se reclutaba rápidamente luego del daño (entre 2 y 3 días después de la lesión) (Arnold et al., 2007).

También se ha mostrado que los monocitos marcados con látex CX3CR1^{lo}/Ly-6C⁺ se convertían al fenotipo CX3CR1^{hi}/Ly-6C⁻ desde el día 2. La célula pierde progresivamente la expresión de Ly6C que se acompaña de expresión de TNF α y de IL-1 β , para expresar TGF- β 1 e IL-10 como célula Ly6C⁻, lo cual estuvo de acuerdo con el análisis de ARN mensajero de citoquinas en el extracto muscular afectado, que muestra que el TNF- α y el IL-1 β tienen un pico de expresión entre los 2 y 3 días. Mientras que desde el día 2 aumenta la expresión de IL-10 y de TGF- β 1 y se mantiene a través de toda la regeneración (Arnold et al., 2007).

Los macrófagos reaparecen en la circulación desde el segundo día posterior a la lesión. Cuando la DT utilizada para depletar de macrófagos se inyectó 4 días después de la inyección de notexina, no se observó diferencias respecto al control, lo que indica que los monocitos circulantes no fueron reclutados en el tejido más allá de los 4 días (Arnold et al., 2007).

Tinciones realizadas con Ki67 muestran como los CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ nunca proliferan mientras que los CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ entran al ciclo celular desde el día 2, duplican en número al día 4 y su tasa de crecimiento disminuye a la mitad al día 7 (Arnold et al., 2007).

6.3 Secreción diferencial de citoquinas por parte de los subtipos de macrófagos
Estudios realizados con RT/PCR demuestran que 4 días después de la lesión los CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ expresan IL-1 β y en menor medida TNF- α mientras que los CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ presentan TGF- β e IL-10 más fuertemente que el inflamatorio. Lo anterior indica que CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ tiene un perfil proinflamatorio y que CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ tiene un perfil antiinflamatorio (Arnold, 2007). Como se vio anteriormente, los subtipos de macrófagos en humanos parecen corresponder a los observados en ratón, en lo que respecta a su estimulación (Arnold, 2007).

6.4 Fagocitosis de debris celular en relación con el cambio fenotípico de los subtipos de macrófagos

Luego de la fagocitosis de mpc, los MPs tratados con LPS disminuyen la secreción de TNF- α y aumentan la secreción de TGF- β (Arnold et al., 2007). La inhibición de la fagocitosis con citocalasina D o anexina V recombinante produce que la secreción de TNF- α y de TGF- β no cambie en presencia de restos celulares. Se sugiere por lo tanto que la fagocitosis de restos celulares induce el cambio fenotípico de macrófago inflamatorio a regenerativo (Arnold et al., 2007).

6.5 Papeles diferenciados de los subtipos de macrófagos sobre mpcs

Los macrófagos CX3CR1^{lo}/Ly6C⁺ aumentan el crecimiento de mpc mientras que los MPs CX3CR1^{hi}/Ly6C⁻ estimulan su diferenciación. Los macrófagos sin tratamiento estimulan el crecimiento y la proliferación, así como la diferenciación y la fusión de miotubos (Arnold et al., 2007).

Los macrófagos tratados con LPS/IFN- γ fueron más eficientes aumentando la proliferación de mpc que los MPs no tratados. Al mismo tiempo se redujo la expresión de miogenina y la formación de miotubos, en relación con experimento utilizando MPs no tratados, por lo que se puede indicar que hay una inhibición de la diferenciación. Al contrario, los MPs tratados con IL-4, respecto a los MPs no tratados, disminuyen ligeramente la proliferación de mpcs pero estimulan la expresión de miogenina y la formación de miotubos (Arnold et al., 2007).

6.6 Papeles diferenciados de los subtipos de macrófagos en la regeneración muscular esquelética.

Cuando se depletaron MO/MP con toxina diftérica (DT), 12 horas antes de inducir lesión con notexina en músculo de ratón CD11b DTR¹, se observó una regeneración tardía y disminuida, con aparición de células adiposas. En cambio la inyección doble con DT que logra una depleción de 24 horas, resultó en la ausencia de indicadores de regeneración, así como la presencia de fibras necróticas hasta el día 7 inclusive (Arnold et al., 2007).

Cuando la DT se inyectó 4 horas después de la notexina, no se observó diferencia en la regeneración con el control. Lo que indica que los MO/MP no entran luego a los tejidos ya que la DT intravenosa no afecta a los MP en tejidos (Arnold et al., 2007).

Es importante que, cuando se administra la DT intramuscularmente luego de que se da la fagocitosis en el tejido, se observó una disminución del diámetro de las miofibrillas en regeneración (Arnold et al., 2007).

¹ En esta cepa de ratones, los MO/MP tienen un receptor para la toxina diftérica (DT) y su administración los mata selectivamente.

6.7 Estudios espacio-temporales

La infiltración de macrófagos y la inducción de la regeneración ocurren en paralelo. Se ha observado que el VEGF fue más efectivo en mantener un aumento de la regeneración que el MCP-1. Podría ser porque el VEGF produce una mayor disponibilidad de factores séricos (Lescaudron et al., 1999). Se ha visto que el infiltrado de monocitos/macrófagos y la revascularización son conspicuos (Roberts et al., 1989; Roberts y McGeachie, 1990) y que la extensión de la regeneración muscular depende de la cantidad de macrófagos presentes en el tejido (Ishiura et al., 1983).

Sin embargo el contacto directo entre macrófagos y células satélites no es requisito para la activación de las células satélites (Lescaudron et al., 1996; Creuzet et al., 1998), ya que en cocultivo de ambas líneas celulares se observan efectos similares a los anotados con células satélites que crecen en medio de cultivo acondicionado por macrófagos. (Cantini et al., 1994).

Cuando se aumentó el llamado a tejido de los macrófagos incremento la regeneración. Se demostró de esta manera que los requisitos para la regeneración no están contenidos dentro del músculo sino que dependen de factores ambientales originados en otros lugares (Lescaudron et al., 1999).

7. Estrategias utilizadas para alterar la función de los macrófagos en la regeneración de las heridas

7.1 Efecto de la alteración de la función de los macrófagos en la regeneración

Al observar la importante función regenerativa del macrófago en el tejido, se sugiere que al aumentar la actividad de los macrófagos en la lesión, llevaría a una mejora marcada en la reparación de la herida. Es por esto que el aumento en la actividad de los macrófagos se ha sugerido antes. Las metodologías que se ensayaron incluían la adición de macrófagos directamente en la herida. También la estimulación de los macrófagos por medio de agentes activadores y la aplicación de factores de crecimiento purificados o de citoquinas que son

producidas por los macrófagos. La mayoría de estos estudios se han probado en ensayos pre clínicos pero algunos de ellos han alcanzado la esfera clínica (DiPietro y Strieter, 2002).

7.1.1 Efecto de la aplicación de macrófagos directamente en la lesión

En experimentos conducidos por Danon et al, (1989), se demostró que la inyección de macrófagos en la herida, corregía las deficiencias en la regeneración de las heridas relacionadas con la edad. Seguidamente, se realizó la aplicación autóloga de macrófagos como una terapia para heridas con pobre regeneración. También se demostró que macrófagos derivados de monocitos obtenidos de sangre periférica mejoraron el proceso de regeneración en heridas decúbito (Danon et al., 1997).

7.1.2 Efecto de la aplicación directa de factores estimulantes de macrófagos en la lesión

Se ha observado un aumento de macrófagos en lesiones en que se ha inyectado glucan, el cual es un factor activador de macrófagos. El tratamiento también induce fibroplasias y re-epitelialización de la herida y una mayor fortaleza del tejido (Leibovich and Danon, 1980; Browder et al., 1988).

Por otro lado, se ha aplicado proteínas recombinantes como el PGDF y ha demostrado un efecto beneficioso en ensayos pre clínicos y estudios clínicos y ahora se encuentra comercialmente para su uso clínico para promover la reparación de heridas difíciles de sanar (DiPietro y Strieter, 2002). Esta acción se ha probado que proviene del efecto que tiene el PDGF de aumentar la función de los macrófagos (Mustoe et al., 1989; Pierce et al., 1989).

La aplicación del Factor estimulador de colonias de macrófagos (CSF-M) se mostró que acelera la reparación de la herida al aumentar la función de los macrófagos (Wu et al., 1997). También, la administración tópica o sistémica de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF-GM), también aumenta la tasa de reparación de la herida, presuntivamente por la estimulación de la función de los macrófagos (Jyung et al., 1994).

Estos estudios proveen argumentos para continuar la investigación del uso de macrófagos y de citoquinas derivadas de macrófagos en el tratamiento de heridas (DiPietro y Strieter, 2002).

Conclusión

A través de este trabajo, se analizaron los efectos del veneno de *B. asper* en tejido muscular así como la inflamación que produce. Se abordaron los elementos de la regeneración muscular normal, dicho esto como la regeneración en el evento de daño muscular únicamente y no de daño vascular. También se identificó al macrófago como célula protagónica de la regeneración muscular y la producción de sus citoquinas como señales necesarias para la buena regeneración del tejido.

De este trabajo se desprende que en el envenenamiento con *B. asper*, una de las características más limitantes de la actividad regenerativa es la actividad hemorrágica del veneno que dificulta la llegada del infiltrado inflamatorio al sitio de lesión. De manera que, la llegada deficiente del infiltrado inflamatorio podría producir un retardo en la entrega de sustancias quimiotácticas o mitogénicas. Así mismo, la activación de células satélite por cuenta de los macrófagos se vería afectada. También, las citoquinas quimiotácticas producidas por las mpcs no surtirían tanto efecto debido a que la destrucción vascular dificultaría el tráfico ordenado de estas sustancias y su difusión hacia una vasculatura normal, donde existen monocitos que pueden ser activados por esos factores.

Por otro lado, el ambiente activador del macrófago en el tiempo (espacio-temporal) se pierde ya que cuando se restaura la vasculatura, dicho ambiente activador se ha difundido. De manera que el macrófago recién llegado no se encuentra frente a los activadores apropiados y posiblemente el cambio fenotípico no suceda de una manera ordenada en el espacio y el tiempo (como sucede en la regeneración completa). Así mismo, se dificulta la llegada de factores angiogénicos liberados por macrófagos que producirían una mejor infiltración del tejido.

Las metodologías que se podrían utilizar para determinar los subtipos de macrófagos y las citoquinas implicadas se detallan en el apéndice. Sin embargo, brevemente se puede indicar que

el primer paso para dilucidar el problema consiste en investigar si los macrófagos tienen un papel relevante en el proceso regenerativo. Dicho problema puede abordarse al utilizar la depleción de

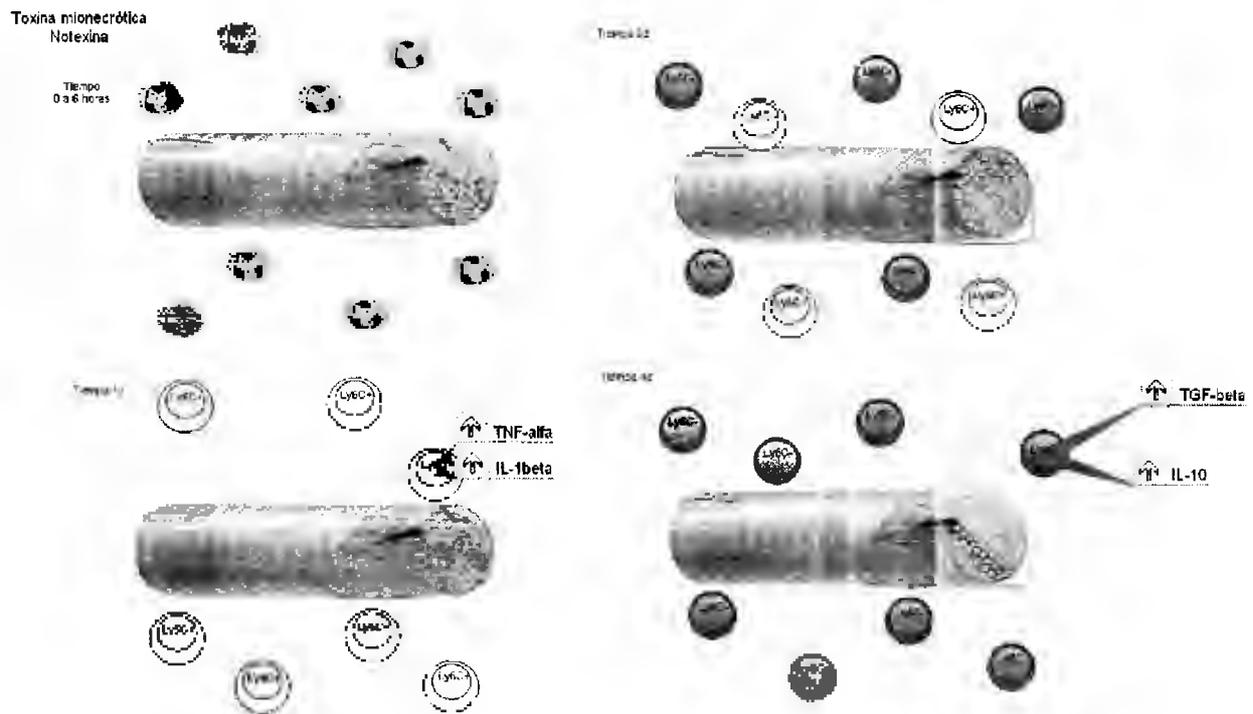


Figura 11. Progreso de la regeneración observado luego de la inyección con notexina en relación con los subtipos de macrófagos. Se observa como una población de neutrófilos es sustituida por macrófagos que gradualmente cambian su fenotipo, lo que conlleva a una secreción diferencial de citoquinas.

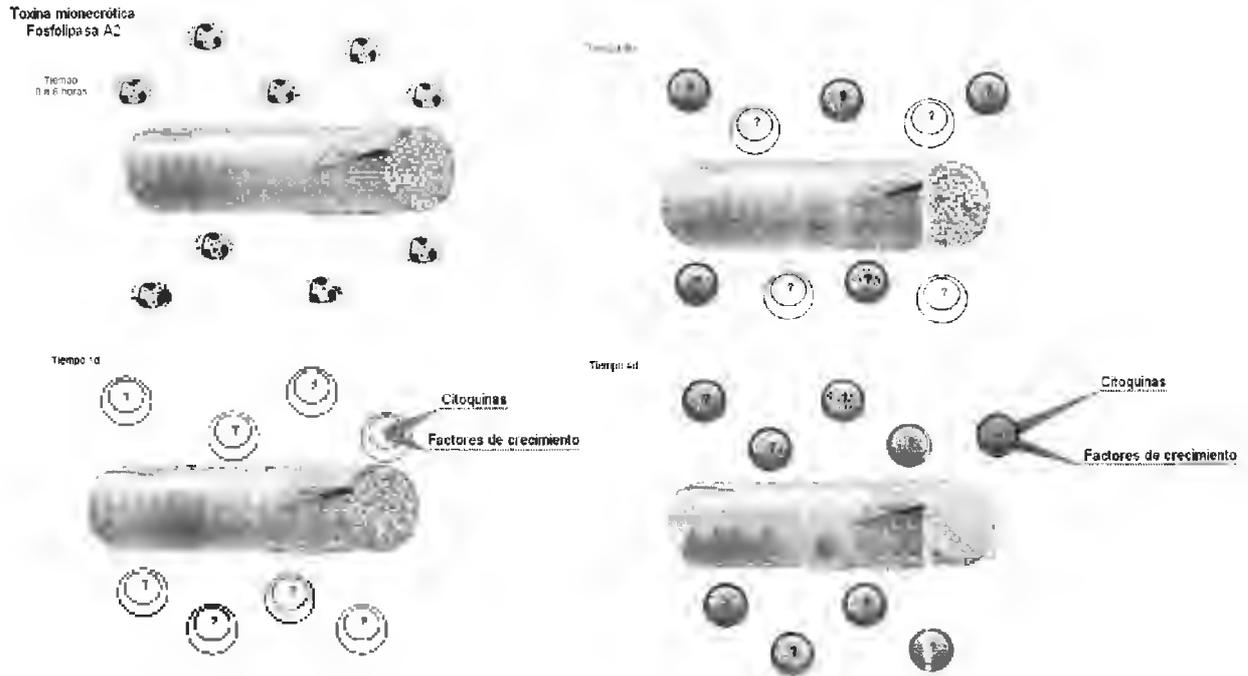


Figura 12. Progreso hipotético de la regeneración luego de la inyección con miotoxina en relación con los subtipos de macrófagos. Subtipos celulares de monocitos/macrófagos desconocidos así como su perfil de citoquinas y factores de crecimiento.

Toxina hemorrágica
BaP1

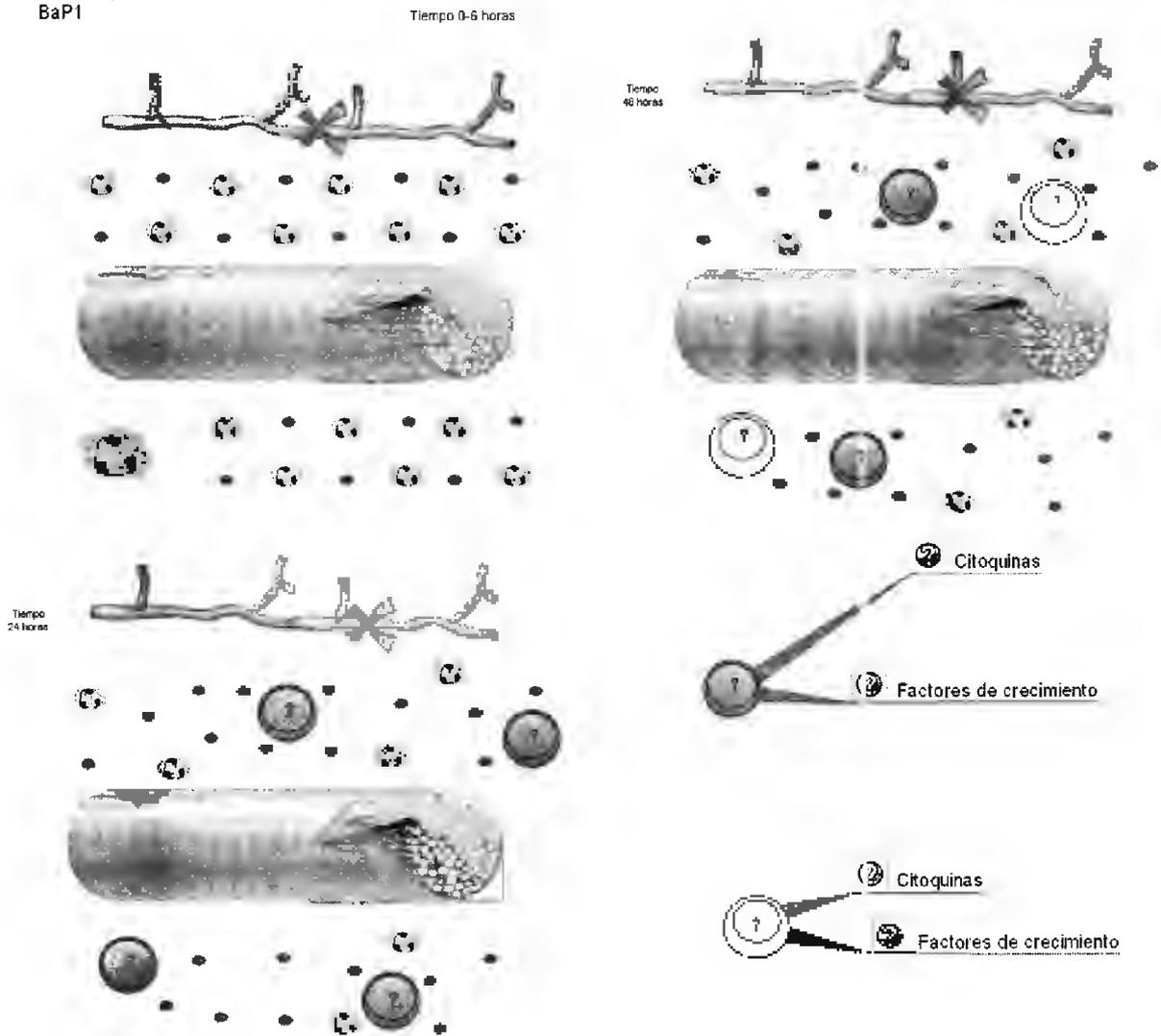


Figura 13. Progreso hipotético de la regeneración luego de la inyección con hemorragina en relación con los subtipos de macrófagos. Subtipos celulares de monocitos/macrófagos desconocidos así como su perfil de citoquinas y factores de crecimiento.

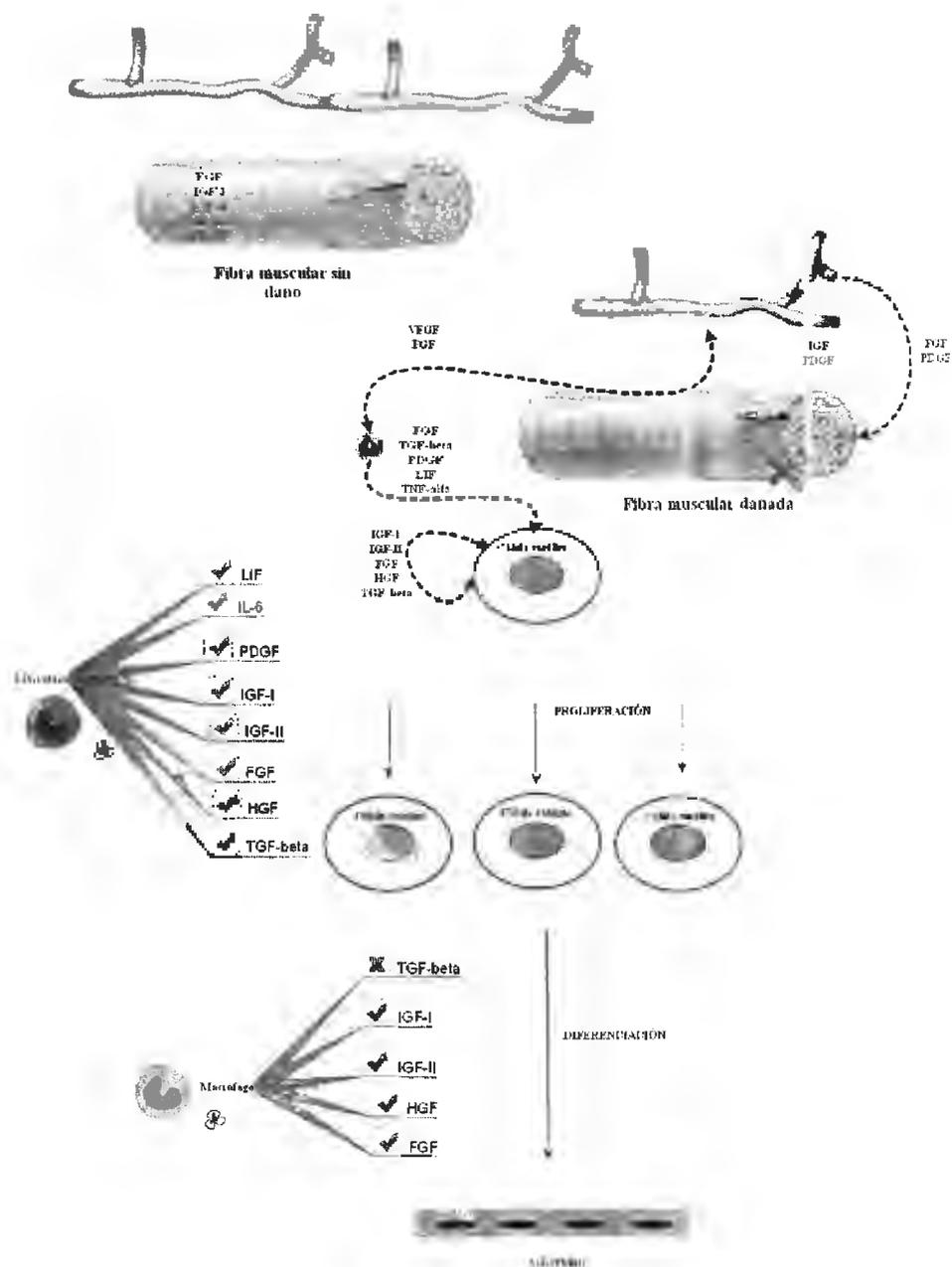


Figura 14. Esquema que muestra los factores de crecimiento y las citoquinas más implicadas en la regeneración muscular y su relación con los macrófagos. Modificado de Hussman et al., 1996, Hawke y Garry, 2001 y Chargé y Rudnicki, 2004.

macrófagos por medio de clodronato encapsulado en liposomas, según la técnica de Van Rooijen (1994), en la que se podría contrastar la regeneración luego del envenenamiento en presencia y en ausencia de macrófagos.

Es de particular importancia contrastar los resultados de la aplicación de hemorraginas con las de una lesión enteramente miotóxica. Esto por cuanto se esperaría que la cinética de la infiltración en la lesión con miotoxina fuera similar a la observada con la notexina puesto que sus características histológicas son semejantes. Por otro lado, el realizar el experimento con hemorraginas podría determinar hasta qué grado la presencia de macrófagos influye en la regeneración luego de la hemorragia. El significado que tendría una regeneración disminuida en un ratón depletado de macrófagos e inyectado con hemorraginas, indicaría que, de alguna forma, el macrófago todavía es capaz de ejercer funciones durante la regeneración aunque exista hemorragia. Mientras que si los resultados obtenidos fueran similares a los del control, querría decir que para el tejido es lo mismo si hay macrófagos que si no los hay, ya que estos no estarían en la capacidad de llegar a la zona de lesión. Además, se podría analizar en qué grado la presencia de macrófagos es importante en la regeneración luego de restaurada la vasculatura.

Es importante enfatizar que los eventos en el músculo lesionado, ya sea por miotoxina o hemorragina, no se detienen por la ausencia de los macrófagos; la liberación de citoquinas y factores de crecimiento por parte de los tejidos no es perpetua, por lo que una hipótesis que se podría plantear es que si el macrófago no arriba a la zona de lesión, cuando las citoquinas y factores de crecimiento que lo activan se encuentran en su concentración activadora para el macrófago, entonces el macrófago no será activado de la manera que el orden de los eventos regenerativos lo requieren. Ese orden sí se observa en el tratamiento con notexina o con miotoxinas de *Bothrops asper*, de manera que el momento en el que sucede la activación del macrófago y el microambiente que genera dicha activación son los necesarios para una buena regeneración, en la medida que los tiempos de activación de las células no se retardan ya que la vasculatura se encuentra íntegra en su mayoría. Por lo tanto, esta hipótesis podría plantear que en el caso de las hemorraginas la activación del macrófago sería diferente, ya que las citoquinas presentes serán distintas en el tiempo, unas aparecen mientras que otras se difunden o son

degradadas. Y de esta manera, un macrófago que arriba al tejido en un momento 1 encontrará un microambiente posiblemente diferente en un momento 2. Como se discutió anteriormente, el macrófago define su fenotipo basado en la información que recibe del entorno, por lo que, si la información es diferente, evidentemente su activación o su evolución hacia otros subtipos se verá afectada.

En la literatura, es evidente que la hemorragia podría producir un retraso en la llegada del macrófago, y ese retraso en un evento ordenado podría traducirse en fibrosis. Lo anterior por cuanto, el macrófago como célula estromal, no sólo secreta factores de crecimiento o citoquinas sino que interactúa con el ambiente, es decir, se autoregula por medio de su microambiente, así como define y regula el ambiente en su entorno.

Si se toma en cuenta la hipótesis reciente de la migración guiada para la revascularización de tejidos, sería interesante realizar un experimento para intentar aumentar la infiltración de macrófagos en el sitio de lesión por medio de la utilización de citoquinas que produzcan un incremento en la migración de macrófagos que, según lo que se ha visto, tendría los siguientes efectos:

- Producción de nueva vascularización del tejido por factores humorales y celulares.
- Producción de actividades fagocíticas de restos celulares.
- Actividades regenerativas por medio de la secreción de productos mitogénicos angiogénicos y reguladores.

Otro punto interesante es que metaloproteinasas de *B. asper* degradan matriz extracelular (Gutiérrez y Rucavado, 2000) de manera que se debería de analizar hasta qué grado esa degradación colabora con la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que se encuentran embebidos en la matriz extracelular, como se explicó anteriormente.

Respecto a la determinación del aumento de las citoquinas posterior al envenenamiento con veneno completo, se conocen los niveles de IL-1, de IL-6 y de TNF- α en cavidad peritoneal (Zamuner et al., 2005). Así mismo, se ha investigado el efecto en la liberación de citoquinas de la inyección de metaloproteinasa BaP1 intraperitonealmente, en la que se encontró una elevación

del TNF- α *in vivo* (Fernandes et al., 2006). Sin embargo, para el estudio de subtipos de macrófagos en la regeneración, se debería de analizar su expresión en los diferentes subtipos de macrófagos, debido a que su determinación a nivel local en músculo es importante, puesto que es el microambiente al que el macrófago se enfrenta cuando llega al tejido.

Además, se ha investigado la producción de IL-1 β , IL-6, CXCL1, CXCL2, IL-8 en cultivos de fibroblastos (Gallagher et al., 2005), más no existen datos respecto al grado de producción otros mediadores inflamatorios y factores de crecimiento por parte de los macrófagos.

Uno de los aspectos importantes, es que se podría realizar determinaciones por medio de RT-PCR para las poblaciones de células inflamatorias presentes en el infiltrado luego del envenenamiento. Esto podría suministrar más datos acerca de los niveles de expresión de TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 y otros, que permitan determinar si sus comportamientos se ajustan o se desvían de los observados en otros tipos de lesión muscular. Si se desviarán, podría sugerir cambios en la cinética de la infiltración o por otro lado, de la expresión fenotípica de los monocitos/macrófagos en el tejido.

También se podría realizar experimentos de denervación/devascularización en el que se induzca miotoxicidad, y de esta manera se podría comparar este efecto con el de la acción del veneno completo ya que reproduciría de alguna manera la miotoxicidad y la isquemia de las células satélite además de la dificultad que presentaría para los macrófagos el poder llegar a la zona de lesión en ausencia de vasculatura.

Es importante rescatar que el TGF- β aumenta en el tejido en el evento de daño muscular y no requiere necesariamente de la presencia de macrófagos para su regulación. Por lo tanto, en vista de las propiedades fibrogénicas que se le atribuyen al TGF- β , sería interesante determinar hasta qué punto la infiltración del macrófago en el tejido lesionado regularía la expresión de TGF- β por parte de las células satélite, expresión que de otra manera sería constitutiva en el tejido a falta de regulación. Lo anterior implica que también es necesario investigar los niveles de TGF- β por parte de las células satélite en el tratamiento con veneno completo, con miotoxinas y con hemorraginas aisladamente, ya que concentraciones elevadas y constantes de TGF- β en el

tratamiento con veneno completo o con hemorraginas podría sugerir una ausencia de regulación de dicho factor de crecimiento. Más aún, si se utilizara depleción de macrófagos por medio de clodronato y luego una miotoxina, y si se encontraran niveles de expresión aumentados de TGF- β , podría sugerir la implicación de los macrófagos como reguladores de la actividad fibrinogénica en el tejido y por lo tanto la implicación del retraso de la infiltración de los macrófagos en la cicatrización observada durante el envenenamiento.

Finalmente, se puede indicar los aspectos positivos que ofrece la investigación de este problema. En primer lugar, guarda relación con resultados obtenidos de investigaciones previas realizadas en el envenenamiento agudo y crónico utilizando veneno completo o hemorraginas y miotoxinas de *Bothrops asper*. Permite abordar la regeneración muscular, al analizar subtipos de macrófagos por medio de una herramienta novedosa mediante el rastreo de macrófagos (desde el estado de monocito) por medio de marcaje con partículas de látex (ver apéndice Chazaud et al., 2003). La obtención de valores para las citoquinas implicadas y los subtipos de macrófagos presentes permitiría predecir cómo se comportaría la regeneración del tejido en diferentes escenarios inflamatorios.

Además tomando en cuenta las metodologías que se han aplicado con éxito a la resolución de úlceras, es importante realizar los protocolos que permitan la dilucidación del papel del macrófago en la regeneración muscular luego del envenenamiento ya que si se probara relevante, se podrían dar pasos importantes en el desarrollo de estudios clínicos que busquen una mejor regeneración por activación o adición de macrófagos en el sitio afectado. Dicho proceso ha iniciado así para el tratamiento de algunas dolencias donde estas metodologías se han probado útiles, y es mi parecer que se debe buscar respuesta a estas preguntas dirigiéndolas hacia el desarrollo de ensayos pre clínicos y clínicos que permitan no solamente la debridación y posterior cicatrización del tejido, como sucede hasta la fecha, sino una adecuada regeneración del tejido muscular, con los beneficios que conlleva para la rehabilitación del paciente.

Bibliografía

Adams, G.R., McCue, S.A. (1998). Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. J Appl Physiol 84: 1716–1722.

Alape, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual and ontogenetic variations. J. Prot. Res 7: 3556-3571.

Almekinders, L.C., Gilbert, J.A. (1986). Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal anti-inflammatory medication. Am J Sports Med 14: 303–308.

Allen, R.E., Boxhorn, L.K. (1987). Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor- β . J Cell Physiol 133: 567–572.

Allen, R.E., Boxhorn, L.K. (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor- β , insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. J Cell Physiol 138: 311–315.

Allen, R.E., Sheehan, S.M., Taylor, R.G., Kendall, T.L., Rice, G.M. (1995). Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells *in vitro*. J Cell Physiol 165: 307–312.

Anderson, J.E., Mitchell, C.M., McGeachie, J.K., Grounds, M.D. (1995). The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice. Exp Cell Res 216: 325–334.

Anghelina, M., Schmeisser, A., Krishnan, P., Moldovan, L., Strasser, R.H., Moldovan, N.I. (2002). Migration of monocytes/macrophages *in vitro* and *in vivo* is accompanied by

MMP12-dependent tunnels formation and by neo-vascularization. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 109(4): 209–215.

Angulo, Y., Lomonte, B. (2005). Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms. Cell Biochem. Funct. (23): 307-313.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet A., Gherardi R. K., Chazaud B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. J Exp Med 204(5): 1057 1069.

Austin, L., Bower, J., Kurek, J., Vakakis., N. (1992). Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. J Neurol Sci 112: 185–191.

Austin L., Burgess A. (1991) Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukemia inhibitory factor and other cytokines. J Neurol Sci, 101, 193-197.

Avila-Agüero, M.L., Paris, M., Hu, S., Peterson, P.K., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Faingezicht, I. (2001). Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. Ped Emer Care 17(6): 425–429

Baird A., Ling N. (1987). Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells: implication for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. Biochem Biophys Res Commun 1987, 142, 428~35.

Bark, T.H., McNurlan, M.A., Lang, C.H., Garlick, P.J. (1998). Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 275: E118–E123.

Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., Sweeney, H.L. (1999). Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. Acta Physiol Scand 167: 301–305.

Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., Musaro, A., Rosenthal, N., Sweeney, H.L.(1998). Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. Proc Natl Acad Sci USA 95: 15603–15607.

Bjarnason, J.B., Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol Ther 62(3): 325-72.

Border WA, Ruoslahti E. (1992). Transforming growth factor-beta: The dark side of tissue repair. J Clin Invest 90, 1-7.

Bower, J., Vakakis, N., Nicola, N.A., Austin, L. (1995). Specific binding of leukemia inhibitory factor to murine myoblasts in culture. J Cell Physiol 164: 93–98.

Buiting A., F. Z., Bakker J., van Rooijen N., Huang L.(1996). Biodistribution of clodronate and liposomes used in the liposome mediated macrophage 'suicide' approach. J Immuno Meth 192(1-2): 55-62.

Cantini, M., Massimino, M.L., Bruson, A., Catani, C., Dalla Libera, L., Carraro, H. (1994). Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. Biochem Biophys Res Commun 202: 1688– 1696.

Cantini, M., Giurisato, E., Radu, C., Tiozzo, S., Pampinella, F., Senigaglia, D., Zaniolo, G., Mazzoleni, F., Vitiello, L. (2002). Macrophage secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts *in vitro* and *in vivo*. Neurol. Sci 23: 189–194.

Cardoso, H. Fan, F. França, M. Jorge, R. Leite, S. Nishioka, A. Avila, I. Sano-Martins, S. Tomy, M. Santoro, A. Chudzinski, S. Castro, A. Kamiguti, E. Kelen, M. Hirata, R. Mirandola, R. Theakston, D. Warrell. (1993). Randomized comparative trial of three

antivenoms in treatment of envenoming by lance-head vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *O.J. Med* 86: 315–325.

Carlson, B.M., Gutmann, E. (1975). Regeneration in free grafts of normal and denervated muscles in the rat: morphology and histochemistry. *Anat Rec* 183: 47–62.

Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J.M., 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33, 31-39.

Chaves, F., Teixeira, C.F.P., Gutiérrez, J.M. (2005). Role of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon* 45: 171-178.

Chargé, S.B.P., Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 84: 209–238.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol* 163(5): 1133-1143.

Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, E., Olander, J.V., Connolly, S.D.T., Stern, D. (1990). Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172: 1535-1545.

Coleman, M., DeMayo, F., Chang Yin, K., Man Lee, H., Geske, R., Montgomery, C., Schwartz, R. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 270: 12109– 12116.

Cooper, R.N., et al. (1999). *In vivo* satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. J Cell Sci 112: 2895–2901.

Cornelison, D.D., Olwin, B.B., Rudnicki, M.A., Wold, B.J. (2000). MyoD(/) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. Dev Biol 224: 122–137.

Cornelison, D.D.W., Wold, B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev Biol 191: 270–283.

Creuzet, S., Lescaudron, L., Li, Z., Fontaine-Pérus, J. (1998). MyoD, Myogenin and desmin-lacZ transgene emphasize the distinct patterns of satellite cell activation in growth and regeneration. Exp Cell Res 243: 241–253.

Danon, D., Kowatch, M.A. and Roth, G.S. (1989). Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. Proceed Nat Acad Sci USA, 86, 2018–20.

Danon, D., Madjar, J., Edinov, E., Knyszynski, A., Brill, S., Diamantshtein, L. and Shinar, E. (1997). Treatment of human ulcers by application of macrophages prepared from a blood unit. Exp Geront, 32, 633–41.

DiPietro. L.A., Strieter. R.M. Macrophages in wound healing. In: Burke. B., Lewis C. The Macrophage. Chapter 10. 2a edición. 2002. Oxford University Press. pgs: 441-444

Dodson M.V., Allen R.E., Hossner K.L.(1985) Ovine somatomedin, multiplication-stimulating activity and insulin promote skeletal muscle satellite cell proliferation *in vitro*, Endocrinology, 117, 2357-2363.

Dominov, J.A., Dunn, J.J., Miller, J.B. (1998). Bcl-2 Expression Identifies an Early Stage of Myogenesis and Promotes Clonal Expansion of Muscle Cells. J Cell Biol 142(Number 2): 537–544.

- Edwards D.R., Murphy G., Reynolds J.J., Whitman S.E., Docherty A.J.P., Angel P., Heath J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenases and metalloproteinase inhibitor. EMBO J, 6, 1899-1914
- Ewton D.A., Florini J.R.(1980). Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and growth hormone on myoblast and myotubes in culture. Endocrinology 106, 577 583
- Falcone, D.J., McCaffrey, T.A., Haimovitz-Friedman, A. and Garcia, M. (1993). Transforming growth factor- β 1 stimulate macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. J Cell Physiol, 155, 595–605.
- Fernandes, C., Zamuner, S.R., Pavan , J., Rucavado A., Gutiérrez J.M., Pereira C. 2006. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from Bothrops asper snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. Toxicon 47: 549–559
- Flaumenhaft R., Moscatelli D., Saksela O., Rifkin D.B. (1989). Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. J Cell Physiol, 140, 75 81.
- Foxman, E.F., Kunkel, E.J., Butcher, E.C. (1999). Integrating Conflicting Chemotactic Signals: The Role of Memory in Leukocyte Navigation. J Cell Biol 147(3): 577–587.
- Fuchtbauer, E.M., Westphal, H. (1992). MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. Dev Dyn 193: 34–39.
- Fukasawa, M., Campeau, J.D., Yanagihara, D.L., Rodgers, K.E. and DiZerega, G.S. (1989). Mitogenic and protein synthetic activity of tissue repair cells: control by the postsurgical macrophage. J Inv Surg, 2, 169–80.

Gal-Levi R, L.Y., Aoki, S., Nakamura, T., Halevy, O. (1998). Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. Biochim Biophys Acta Physiol Scand 1402: 39–51.

Gallagher P., Bao Y., Solange M.T. Serrano b, Gavin D. Laing c, R. David G. Theakston c, Gutiérrez J.M., Escalante T., Zigrinoe P., Moura-da-Silva A., Nischt R., Mauche C., Moskaluk C., Fox J. 2005. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: *In vitro* and *in vivo* gene expression analysis of the effects of the toxin. Arch Biochem and Biophys 441: 1–15

Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 19: 71–82.

Gimbrome, M.A. (1984). Macrophages, neovascularization and the growth of vascular cells., MA: Martinus Nihoff Publishers.

Gordon, S. (1995). The macrophage. Bioessays 11(17): 977-86.

Greene, E.A., Allen, R.E. (1991). Growth factor regulation of bovine satellite cell growth in vitro. J Anim Sci 69: 146–152.

Grounds M.D. (1991). Towards understanding skeletal muscle regeneration. Pathol Res Pract, 118, 1-22.

Grounds, M.D., Garrett, K.L., Lai, M.C., Wright, W.E., Beilharz, M.W. (1992). Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. Cell Tissue Res 267: 99–104.

Grounds M.D., Yablonka-Reuveni Z. (1993). Molecular and cellular biology of skeletal muscle regeneration. In: Partridge T, ed. *Molecular and Cellular Biology Muscular Dystrophy*. Chapman and Hall, London, 1993, pp. 210-257.

Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R. C., Walsh, K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. Mol. Cell. Biol 15: 3823–3829.

Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Bolaños, R. (1980a). Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. Toxicon 18: 603-610.

Gutiérrez, J.M., Bolaños, R. (1980b). El problema de los efectos hemorragico y mionecrotico por mordeduras de serpiente en el continente americano. Bol Of Sanit Panama 89(2): 149-158.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F. (1980c). Efectos proteolitico, hemorragico y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. Toxicon 18: 315-321.

Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., Odell, G.V. (1984). Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. Experimental Molecular Pathology 40(3): 367-79.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Cerdas, L. (1986a). Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. Rev Biol Trop 34(2): 209-219.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Mata, E., Cerdas, L.(1986b). Skeletal muscle regeneration after mionecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) venom. Toxicon 24(2): 223-231.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1995). Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 33: 1405–1424.

Gutiérrez, J. M., Romero, M., Díaz, C., Borkow, G., Ovadia, M., (1995a). Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon 33: 19-29.

Gutiérrez, J.M., Romero, M., Nuñez, J., Chaves F., Borkow, G., Ovadia, M. (1995b). Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). Exp Mol Path 62: 28-41.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1997). Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function, and Mechanism*. John Wiley & Sons, England: 321-352.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A.. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie 82: 841–850

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (2003). Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad, V. (Eds.), Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, Sarvier, Sao Paulo. 310-323.

Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2:insights into the mechanism of local and systemic myotoxicity. Toxicon(42): 915-931.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante T., Díaz C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinas: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon 45: 997-1011.

Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Escalante, T., Rucavado, A. (2006). Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. Microv. Res 71: 55-63.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., León, G., Rucavado, A., Chaves, F., Angulo, Y. (2007). Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. Curr. Pharm. Des 13: 2935-2950

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Chaves, F., Díaz, C. (Pendiente para publicación en el 2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon, sometido a su consideración en el presente año (2008).

Halevy, O., Novitch, G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., Lassar, A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. Science 267: 1018–1021.

Harris, J.B. (2003). Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. Toxicon 42: 933-945.

Hawke, T.J., Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J App Phys 91(2): 534–551.

Hubank, M., Schatz, D.G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Res 22: 5640–5648.

Husmann I., Soulet L., Gautron J., Martelly I., Barritault D. (1996). Growth Factors in Skeletal Muscle Regeneration. Citok growth fact rev 7: 249-258.

Ignatz, R.A., Massague, J. (1986). Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem 26: 4337-4345.

Ishiura, S., Nonaka, I., Fijita, T., Sugita, H. (1983). Effect of cycloheximide administration on bupivacaine-induced acute muscle degradation. J Bioch Bioph Res Commun 94: 1631–1636.

Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T. y Falcone, D.J. (1985). Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. Blood, 65, 79–84.

Jennische E., Skottner A., Hansson H.A. (1987). Satellite cells express the trophic factor IGF-1 in regenerating skeletal muscle. Acta Physiol Scand, 129, 9-15.

Joseph-Silverstein J., Consigli S.A., Lyser K.M., Vet Pault C. Basic fibroblast growth factor in the chick embryo: immune-localization to striated muscle cells and their precursors. J Cell Biol 1989, 108, 2459-2466.

Jyung, R.W., Wu, L., Pierce, G.F. and Mustoe, T.A. (1994). Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: differential action on incisional wound healing. Surgery, 115, 325–34.

Kay, P.H., Marlow, S.A., Mitchell, C.A., Papadimitriou, J.M. (1993). Studies on the evolution and function of different forms of the mouse myogenic gene Myo-D1 and upstream flanking region. Gene 124: 215–222.

Kay, P.H., Mitchell, C.A., Akkari, A., Papadimitriou, J.M. (1995). Association of an unusual form of a Pax7-like gene with increased efficiency of skeletal muscle regeneration. Gene 163: 171–177.

Kay, P.H., Harmon, D., Fletcher, S., Robertson, T., Ziman, M., Papadimitriou, J.M. (1998). Pax7 includes two polymorphic homeoboxes which contain rearrangements associated with differences in the ability to regenerate damaged skeletal muscle in adult mice. Int J Biochem Cell Biol 30: 261–269.

Klein-Ogus, C., Harris, J.B. (1983). Preliminary observations of satellite cells in undamaged fibres of the rat soleus muscle assaulted by a snake-venomtoxin. Cell Tissue Res. 230: 671–676.

Kovacs, E.J. and DiPietro, L.A. (1994). Fibrogenic cytokines and connective tissue production. FASEB Journal, 8, 854–61.

Langen, R., Van Der velden, J., Schols, A., Kelders, M., Wouters, E., Janssen-Heininger, Y. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization The FASEB Journal 18: 227-237.

Lefaucheur, J., Sebille, A. (1995). Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin like growth factor I. J Neuroimmunol 57: 85–91.

Lefaucheur, J.P., Gjata, B., Lafont, H., Sebille, A. (1996). Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. J Neuroimmunol 70: 37–44.

Lefaucheur, J.P., Sebille, A. (1995). The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. Neuromuscl. Disord 5: 501–509.

Leibovich, S.J. and Danon, D. (1980). Promotion of wound repair in mice by application of glucan. J Retic Soc. 27, 1–11.

Leibovich, S.J. and Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. American Journal of Pathology, 78, 71–91.

Lescaudron, L., Merly, F., Fontaine-Perus, J., Gardahaut, M-F. (1996). Soluble growth factors from mouse macrophages stimulate satellite cell proliferation in turkey and in the mouse. J Mus Res Cell Motil: 17:223.

Lescaudron, L., Peltekian, E., Fontaine-Perus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L., Parrish, E. (1999). Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. Neuromus Disorders 9: 72–80.

Li, Y. (2003). TNF- α is a mitogen in skeletal muscle. American Journal of Cell Physiology(285): 370-376.

Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LÅ (1993) Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. Inflammation 17, 93-105.

Madlener, M., Parks, W.C., Werner, S. (1998). Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. Exp Cell Research 242: 201–210.

Maley, M.A., Fan, Y., Beilharz, M.W., Grounds, M.D. (1994). Intrinsic differences in MyoD and myogenin expression between primary cultures of SJL/J and BALB/C skeletal muscle. Exp Cell Res 211: 99–107.

Marumo, T., Schini-Kerth, V.B., Busse, R. (1999). Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. Diabetes 48: 1131–1137.

Mauro, A. (1961). Satellite cells of skeletal muscle fibres. J Biophys Biochem Cytol 9: 493–495.

McLennan, I. S. (1996). Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. J Anat 188(1): 17–28.

McLennan, I.S. (1993). Resident macrophages (ED1- and ED2-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle. Cell Tissue Res 272: 193–196.

McPherron, A.C., A, Lawler., S, Lee. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature 387: 83–90.

Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F., Gardahaut, M.F. (1999). Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. Muscle Nerve 22: 724–732.

Miller, K.J., Thaloor, D., Matteson, S., Pavlath, G.K. (2000). Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 278: C174– C181.

Moldovan, L., Moldovan N.I. (2005). Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. Mech Ang. B. Basel: 127-146.

Moldovan, N.I. (2002). Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end. J Hemat Stem Cell Res 11(2): 179-94.

Moreira, L., Borkow, G., Ovidia, M., Gutiérrez, J.M. (1994). Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. Toxicon 32: 977-987.

Moreira, L., Gutiérrez, J.M., Borkow, G., Ovidia, M. (1992). Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Exp. Mol. Pathol 57: 124-133.

Muir, A.R., Kanji, A.H., Allbrook, D. (1965). The structure of the satellite cells in skeletal muscle. J Anat 99(3): 435-44.

Mukesh Summan, G. L. W., Robert R. Mercer, Rebecca Chapman, Tracy Hulderman, Nico Van Rooijen, Petia P. Simeonova (2006). Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. Am J Phys Reg Integ Comp Ph 290: R1488-R1495.

Muller-Sieburg, C.E., Deryunira, E. (1995). The stromal cells' guide to the stem cell universe. Stem Cells 13: 477-486.

Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. Nature 400: 581–585.

Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Rosenthal, N. (2001). Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. Nat Genet 27: 195–200.

Mustoe, T.A., Purdy, J., Gramates, P., Deuel, T.F., Thomason, A. and Pierce, G.F. (1989). Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. Am J Surgery, 158, 345–50.

Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. J Clin Invest 79: 319–326.

Nehls, V., Herrmann, R., Huhnken, M. (1998). Guided migration as a novel mechanism of capillary network remodeling is regulated by basic fibroblast growth factor. Histochem Cell Biol 109: 319–329.

Nilsen-Hamilton M. (1990). Transforming growth factor-beta and its actions on cellular growth and differentiation. CurrTop Dev Biol, 24, 95 136.

Noble, M., Murray, K., Stroobant, P., Waterfield, M.D., Riddle, P. (1988). Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type 2-astrocyte progenitor cell. Nature 333: 560-562.

Odelberg, S.J., Kollhoff, A., Keating, M.T. (2000). Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. Cell Tissue Res 103: 1099–1109.

Olson E.N., Sternberg E., Shah Hu J., Spizz G., Wilcox C. (1986). Regulation of myogenic differentiation by type/3 trans-forming growth factor. J Cell Biol, 103, 1799-1805

Orimo, S., Hiyamuta, E., Arahata, K., Sugita, H. (1991). Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. Muscle Nerve 14: 515–520.

Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Lingelbach, J., Masakowski, V.R., Griffin, F.L., Senior, R.M. *et al.* (1989). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. J Cell Biol, 109, 429–40.

Pimorady-Esfahani, A., Grounds, M.D., McMEnamin, P. (1997). Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. Muscle Nerve 20: 158–166.

Popovich P., Inge Huitinga P., van Rooijen N., Stokes B.(1999). Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury. Exp Neurology 158: 351:365.

Porras-Reyes, B.H., Blair, H.C., Jeffrey, J.J. and Mustoe, T.A. (1991). Collagenase production at the border of granulation tissue in a healing wound: macrophage and mesenchymal collagenase production *in vivo*. Conn Tissue Res, 27, 63–71.

Ramon, C.J., Langen, J.L., Van der Velden, J., Annemie, M., Schols, W.J., Marco, C.J., Kelders, M., Emiel, F., Wouters, M., Yvonne, M., Janssen-heininger, W. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. The FASEB Journal 18: 227-237.

Rantanen, J., Hurme, T., Lukka, R., Heino, J., Kalimo, H. (1995). Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. Lab Invest 72: 341–347.

Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J. and Werb, Z. (1988). Wound macrophages express TGF- α and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. Science, 241, 708–12.

Rappolee, D.A., Werb, Z. (1992). Macrophage-derived growth factors. Curr Top Microbiol Immunol 181: 87–140.

Razzaque, M.S., El-Hallak, M., Azouz, A., Taguchi, T. (2005). Tissue Scarring: Lessons from Wound Healing Fibrogenesis: Cellular and Molecular Basis. S. US: 1-8.

Roberts A.B., Joyce M.E., Bolander M.E., Sporn M.B. (1986). Transforming growth factor β (TGF β): a multifunctional effector of both soft and hard tissue regeneration. In: Westermarck B, Betsholtz C, H6kfelt B, eds. *Growth Factors in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*. Excerpta Medica, Amsterdam, 89-101.

Roberts A.B., Sporn M.B., Assoian R.K., Smith J.M., Roche N.S., Wakefield L.M., Heine U.I., Liotta L.A., Falange V., Kehrl J.H., Fauci A.S. Transforming growth factor: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. Proc Natl Acad SciUSA 1986, 83, 4167-4171.

Roberts, P., McGeachie, J.K. (1990). Endothelial cell activation during angiogenesis in freely transplanted skeletal muscles in mice and its relationship to the onset of myogenesis. J Anat 169: 197– 207.

Roberts, P., McGeachie, J.K., Grounds, M.D., Smith, E.R. (1989). Initiation and duration of myogenic precursor cell replication in transplants of intact skeletal muscles: an autoradiographic study in mice. Anat Rec 224: 1-6.

Robertson, T.A., Grounds, M.D., Papadimitriou, J.M. (1993). The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. Exp Cell Res 2(207): 321-31.

Rosenthal S.M., Brown E.J., Brunetti A., Goldfine J.D. (1991). Fibro-blast growth factor inhibits insulin-like growth factor-II (IGF-II) gene expression and increases IGF-I receptor abundance in BC3H-1 muscle cells. Mol Endocrinol, 5, 678-684.

Ross, R., Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. Cell 46: 156-169.

Rucavado, A., Lomonte, B., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Exp Mol Pathol 63: 186-199.

Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C.F.P., Fernández, C.M., Díaz, C., Gutiérrez, J.M. (2002). Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. Med. Inflamm 11: 121-128.

Rudnicki, M. A., Schlegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell 75: 1351-1359

Ruoslahti E., Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell 1992, 64, 869-876.

- Sato, Y., Rifkin, D.B. (1988). Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis and DNA synthesis. J. Cell Biol. 107: 1199-1205.
- Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M., Shitara, K., Nakahata, T., Shibuya, M. (2001). Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. Blood 97: 785–791.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843–5.
- Schreiber, A.B., Winkler, M.E., Derynck, R. (1986). Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science 232: 1250–1253.
- Schultz, E., Gibson, M.C., Champion, T. (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. J Exp Zool 206: 451–456.
- Schultz, E., Jaryszak, D.L., Valliere, C.R. (1985). Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. Mus Nerve 8: 217–222.
- Schultz, E., McCormick, K.M. (1994). Skeletal muscle satellite cells. Rev Phys, Biochem & Pharma 123: 213-57.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. Cell 102: 777–786.
- Semsarian, C., Wu, M.J., Ju, Y.K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D.G., Harvey, R.P., Graham, R.M. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. Nature 400: 576–581.

Smith, C.K., Janney, M.J., Allen, R.E. (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. J Cell Physiol 159: 379–385.

Snow, M.H. (1983). A quantitative ultrastructure analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. Anat Rec 207: 593–604.

Snow, M.H. (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing II. An autoradiographic study. Anat. Rec 188: 201–217.

Sonnet, C., Lafuste, P., Arnold, L., Brigitte, M., Poron, F., Authier, F., Chrétien, F., Gherardi, R. K. Chazaud, B. (2006). Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. J Cell Sci 119: 2497-2507.

Spangenburg, E.E., Booth, F.W. (2002). Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. Am J Physiol Cell Physiol 283: C204–C211.

Stamler, J.S., Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiol Rev 81: 209–237.

Streuli C.H., Schmidhauser C., Kokrin M., Bissel M.J., Derynck R. (1993). Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta gene. J Cell Biol 1993, 120, 253-260.

Summan, M., Mercer R, Chapman R., Hulderman T., Van Rooijen N., Simeonova P. (2006). Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. Am Journal of Phys Regul Integ Comp Phys 290: R1488-R1495.

Suzuki, S., Yamanouchi, K., Soeta, C., Katakai, Y., Harada, R., Naito, K., Tojo, H. (2002). Skeletal muscle injury induces hepatocyte growth factor expression in spleen. Biochem Biophys Res Commun 292: 709–714.

- Tacke F., F. G., Jakubzick C., van Rooijen N., Merad M., Randolph G. (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. J Exp Med 203(3): 583-597.
- Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., Lassar, A. B. (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. Science 242: 405–411.
- Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., Allen, R.E., Greene, E.A. Allen, E.(1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. Dev Biol 194: 114–128.
- Tatsumi, R., Sheehan, S.M., Iwasaki, H., Hattori, A., Allen, R.E. (2001). Mechanical stretch induces activation of skeletal muscle satellite cells *in vitro*. Exp Cell Res 267: 107–114.
- Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y. (2003a). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. Toxicon 42: 947-962.
- Teixeira C. F. P.; Zamuner S. R.; Zuliani J. P.; Fernandes C. M.; Cruz-Hofling M. A.; Fernandes I.; Chaves F.; Gutierrez J. M. (2003b). 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: 449-459.
- Tidball, J.G. (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. Med Sci Sports Exercise 27: 1022–1032.
- Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Yang, F., Dang, T.D., Rowley, D.R. (2002). Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. Cancer Research 62: 6021–6025.

- Vakakis, N., Bower, J., Austin, L. (1995). *In vitro* myoblast to myotube transformations in the presence of leukemia inhibitory factor. N Int J Biochem Cell Biol 27: 329–335.
- Van Rooijen N, S. A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. J Immuno Meth 174(1-2): 83-93.
- Vater, R., Cullen, M.J., Harris, J.B. (1994). The expression of vimentin in satellite cells of regenerating muscle *in vivo*. Histochem. J 26: 916–928.
- Wahl, S., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B. Sporn, M.B, (1987). Transforming growth factor type 13 induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5788-5792.
- Warrell, D.A (1999). WHO/SEARO guidelines for the clinical management of snake bites in the southeast Asian region. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 30 (Suppl. 1): 1-85.
- Welgus, H.G., Campbell, E.J., Cury, J.D., Eisen, A.Z., Senior, R.M., Wilhelm, S.M. *et al.* (1990). Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation and expression during cellular development. J Clin Inv, 86, 1496–502.
- Wisemann D.M., Polverini P.J., Kamp D.W., Leibovich S.J. (1988). Transforming growth factor-beta (TGF β 1) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. Bioch Bioph Res Commun 57, 793-800.
- Wu, L., Yu, Y.L., Galiano, R.D., Roth, S.I. and Mustoe, T.A. (1997). Macrophage colony-stimulating factor accelerates wound healing and upregulates TGF- β 1mRNA levels through tissue macrophages. J Surg Res, 72, 162–9.
- Xiong, M., Elson, G., Legarda, D. and Leibovich, S.J. (1998). Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate and the inducible nitric oxide synthase pathway. Am J Path, 153, 587–98.

Yablonka-Reuveni, Z., Rivera, A.J. (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. Dev Biol 164: 588–603.

Zabel, D.D., Feng, J.J., Scheuenstuhl, H., Hunt, T.K. and Hussain, M.Z. (1996). Lactate stimulation macrophage-derived angiogenic activity is associated with inhibition of poly(ADP-ribose) synthesis. Lab Inv, 74, 644–9.

Zammit, P.S., Heslop, L., Hudon, V., Rosenblatt, J.D., Tajbakhsh, S., Buckingham, M.E., Beauchamp, J.R., Partridge, T.A. (2002). Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. Exp Cell Res 281: 39–49.

Zammit, P.S., Partridge, T.A., Zipora, Yablonka-Reu, Z. (2006). The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. J Histochem & Cyt 54(11): 1177–1191.

Zamuner, S.R., Pavan, J., Fernandes C., Gutiérrez, J.M, Pereira Teixeira, C. 2005. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. Toxicon 46: 806-813

Anexos

Liposomas

Los liposomas son esferas artificialmente preparadas que consisten en bicapas fosfolipídicas concéntricas separadas por compartimentos acuosos (Van Rooijen, 1994). Los liposomas multilamelares grandes son más eficientes eliminando macrófagos que los unilamelares pequeños (Van Rooijen N, 1994). Parte de la solución acuosa en que se disuelven los liposomas junto a moléculas hidrofílicas como CL2MBP, será encapsulada durante la formación de los liposomas (Van Rooijen, 1994).

Mecanismo de acción de los liposomas con clodronato

El CL2MBP es una droga no tóxica en si misma ni dentro de liposomas. La droga libre no traspasa membranas fácilmente y tiene una vida media muy corta. Una vez que el clodronato entra a las células fagocíticas, usando liposomas como vehículo, la droga no escapa de la célula. El CL2MBP liberado de liposomas o de macrófagos muertos no reingresa a las células en cantidades que afecten su metabolismo (Van Rooijen, 1994).

Luego de la disrupción de bicapas fosfolipídicas de los liposomas por la influencia de fosfolipasas lisosomales en el macrófago, la droga, es liberada dentro de la célula. El mecanismo exacto por el cual concentraciones altas de clodronato afectan el metabolismo celular aún no se conoce (Van Rooijen, 1994).

Fisiología de los liposomas

El clodronato es un bifosfonato de bajo peso molecular y soluble en agua, cargado negativamente. Esto puede explicarse por que el atrapamiento de clodronato en liposomas cargados negativamente es menor que en liposomas neutros. El atrapamiento de los liposomas confeccionados con fosfatidilcolina y colesterol es cercano al 2,9% del clodronato en la solución original. Por ello se utilizan ciclos de congelamiento/descongelamiento (freeze/thaw) que aumentan la eficacia del atrapamiento de clodronato en los liposomas. Los liposomas EPC/Chol (7:1.3) son la formulación óptima de liposomas cuando se pretende depleción de macrófagos (Buiting et al., 1996).

La concentración de clodronato en sangre disminuye rápidamente luego de la inyección con liposomas con clodronato. Se ha observado que el aclaramiento de liposomas de la sangre ocurre principalmente en los primeros minutos luego de la inyección y se completa a las 3 horas (Buiting et al., 1996).

Por otro lado, los restos celulares sólo estuvieron presentes durante los primeros 2 días luego de la depleción de los macrófagos. Lo que implica que experimentos *in vivo* pueden realizarse 48 horas luego del tratamiento con liposomas con clodronato (Buiting et al., 1996). De manera que los experimentos comiencen 2 días después del tratamiento con el CL2MBP/lip, a pesar de que se sabe que estos son depletados desde un día después de la inyección. Pero 2 días después, los remanentes celulares han sido eliminados del bazo y las moléculas liberadas por los macrófagos estarían en su valor normal (Van Rooijen N, 1994).

Ha sido bien establecido que tras un breve influjo inicial de neutrófilos en el músculo, los macrófagos se vuelven la célula inflamatoria dominante por el día 1 y con niveles pico en el día 3 luego de la lesión (Summan et al., 2006).

De manera consistente con un rol de los macrófagos en los mecanismos regenerativos, están las observaciones *in vivo* que indican que la regeneración muscular posterior a la lesión inicia aproximadamente en el momento en que hay un pico de infiltración de los macrófagos (Summan et al., 2006).

La tinción con hematoxilina y eosina indica un considerable infiltrado inflamatorio, principalmente muchas células mononucleares al tercer día luego de la lesión. En cambio el influjo de células inflamatorias al tejido lesionado, en los ratones tratados con Clo/lip fue significativamente reducido con la administración de liposomas con clodronato (Summan et al., 2006).

Análisis morfométricos confirman que a los 9 días luego de la lesión, la inflamación intersticial y el porcentaje de miofibras necrosadas, era significativamente superior en los ratones tratados con

Clo/lip, en comparación con los ratones tratados con PBS/lip. Además, a los 14 días, la acumulación intersticial de grasa era significativamente mayor en el grupo tratado con clodronato que en el grupo tratado con PBS (Summan et al., 2006).

El tratamiento con Clo/lip, que tiene como blanco principalmente MO/MP periféricos y resulta en una atenuación marcada del pico de respuesta inflamatoria en el tejido lesionado en los primeros 3 días. Comprende a su vez una disminución de la expresión de genes, que codifican por mediadores que afectan la regeneración y reparación muscular (Summan et al., 2006).

El tratamiento con liposomas sólo afecta a monocitos y macrófagos, porque el tratamiento no es tóxico para células no fagocíticas. La reducción de los monocitos/macrófagos en el tejido también se asoció a la disminución, tanto de mediadores inflamatorios como TNF- α y MCP/1 como de factores de crecimiento como IGF1 e IGFBP. Los miembros de la familia de IGF se conoce que juegan un papel esencial en la regulación de la miogénesis. Dichos factores y otros afectan la proliferación y diferenciación de células precursoras musculares (Summan et al., 2006).

La modulación por el aumento o disminución del influjo de macrófagos en el tejido lesionado se observa como una estrategia atractiva para la intervención terapéutica (Summan et al., 2006).

Preparación de liposomas

Liposomas multilamelares basados en un método modificado del original de Van Rooijen (Popovich et al., 1999).

1. Se disuelven 86 mg de fosfatidilcolina con 8 mg de colesterol (Sigma St Louis, MO) en una razón de 6:1 en 10 ml de cloroformo en un balón (flask) de fondo redondo. Luego se seca in vacuo en un evaporador rotatorio para formar un film.
2. El film fue dispersado en liposomas luego de la adición de 2,5 g de bifosfonato de diclorometileno (CL2MBP) o clodronato a 10 ml de PBS.

3. La preparación se mantiene a temperatura ambiente por 2 horas adicionales. Los liposomas se centrifugan a 100000 xg por 30 minutos y son resuspendidos en 4 ml de PBS.
4. Para la depleción de macrófagos los ratones recibieron inyecciones, 2 ml por inyección de CLO-LIP en la vena de la cola, el día 1, 3 y 6 luego de la lesión. Para la administración intravenosa, se inyecta 0,1ml de suspensión por cada 10g de peso corporal (Van Rooijen N, 1994).

Protocolo de inyección de los liposomas para obtener depleción de macrófagos por tiempos mayores

Los ratones son inyectados con liposomas con clodronato o liposomas con PBS 2 días antes (0.2 ml i.v de liposomas a través de la vena de la cola) y 2 horas antes (0.1 ml i.p de liposomas) de inducir la lesión muscular. De manera adicional, en los estudios de 9 y 14 días, se administró liposomas (0.1mL i.p) cada tercer día luego de la lesión (Summan et al., 2006).

Es importante aclarar que en el estudio para evaluar el resultado de tratamiento con clodronato se realizaron frotis de sangre periférica que no mostraron una diferencia significativa entre el tratamiento con liposomas con clodronato y el tratamiento con liposomas con PBS. Por lo tanto este método no se debería de considerar como una estrategia cuantitativa de peso para evaluar el efecto del tratamiento con clodronato (Summan et al., 2006).

En los estudios realizados en el día 3 luego de la lesión se observa un infiltrado masivo de macrófagos en el área del músculo lesionado en los ratones tratados con liposomas con PBS (PBS lip) mientras que se dio una disminución de más del 50% de la infiltración del tejido por macrófagos en los ratones tratados con Clo/lip (Summan et al., 2006).

Metodologías para determinar los subtipos de macrófagos en músculo esquelético

Marcaje con látex para monocitos Ly6C^{hi}

Se administran liposomas con clodronato (i.v) que resulta en una depleción de los monocitos en sangre a las 18 horas. La inyección de partículas de látex iv. 18 horas después de la administración de clodronato cuando los monocitos estaban ausentes en la sangre, no previene que los monocitos se marquen con las micropartículas. Los monocitos aparecen marcados en sangre luego de que los monocitos circulantes se restablecen de la depleción transitoria por acción de los liposomas con clodronato (Tacke et al., 2006).

La eficiencia en el marcaje es de 10 al 15% del total de monocitos en sangre. Los monocitos en sangre látex positivos, que reaparecen luego de la depleción, no se transforman rápidamente en monocitos Ly6C⁻ a diferencia de los monocitos marcados con látex sin previa depleción con liposomas con clodronato. Este último marcaje con látex sin previa depleción produce que los monocitos pasen rápidamente a ser Ly6C⁻. La depleción y el posterior marcaje con micropartículas de látex aseguran un marcaje por 7 días aproximadamente. Entonces el protocolo anterior guía hacia el marcaje estable de los monocitos Ly6C⁺ (Tacke et al., 2006).

Los experimentos de Tacke et al. (2006) Son consistentes con la posibilidad de que precursores de monocitos en médula ósea hayan engolfado linfocitos B y neutrófilos que se localizan en la médula ósea, luego de retirarse del bazo. Dicho engolfamiento por parte de los monocitos produce su propio marcaje antes de entrar a circulación como monocitos Ly6C^{hi} (Tacke et al., 2006).

Se ha observado que utilizando partículas de látex fluorescente se puede alcanzar el marcaje de dos subconjuntos de macrófagos, los monocitos macrófagos Ly6C⁺ y los Mo/MP Ly6C⁻. el protocolo se detalla a continuación:

Se preparan las microesferas de látex. Se diluyen microesferas FITC conjugadas de 0,5µm de diámetro 1:25 en PBS.

Para conseguir el marcaje del subtipo Ly6C⁻ se inyectan las partículas de látex marcadas sin depleción previa de los macrófagos (250 µL de la dilución en la vena lateral de la cola), dentro de 24 horas todos los monocitos látex positivos en circulación son del subtipo Ly6C⁻. Lo anterior porque por una razón hasta ahora desconocida, la fagocitosis directa de las partículas de látex por parte de los monocitos en sangre produce el cambio fenotípico del subtipo Ly6C⁺ al Ly6C⁻ (Tacke et al., 2006).

Por otro lado, si lo que interesa es marcar el subtipo Ly6C⁺ entonces se administra una dosis de clodronato de 250 µL previo a la inyección de las partículas de látex marcado (250 µL de la dilución en la vena lateral de la cola). El procedimiento anterior, resulta en una depleción de monocitos por medio de liposomas con clodronato, tanto en sangre como en hígado y bazo. Otras poblaciones permanecen protegidas como se indico, anteriormente ya que los liposomas con clodronato no cruzan las barreras vasculares. De esta manera, se consigue un marcaje estable de los monocitos subtipo Ly6C⁺ por alrededor de 7 días en ausencia de cualquier otra alteración en los ratones.

Para la citometría de flujo se pueden utilizar anticuerpos anti Ly6C y anti F4/80 y las partículas de látex en un citómetro de flujo de por lo menos tres colores separados.

Por lo tanto, es posible estudiar el efecto que tienen los diferentes subsets en la respuesta inflamatoria de la siguiente manera:

1. Depleción de macrófagos con liposomas con clodronato.
2. Marcaje de MO/MP en ratón por medio de inyección con micropartículas de látex.
3. Inducción de lesión muscular en ratón por medio de veneno completo de *Bothrops asper*.
4. Obtención de los macrófagos infiltrados en el tejido muscular en tiempos determinados, concomitante con la medición de TNF- α y TGF- β en el tejido.
5. Marcaje de los macrófagos obtenidos en el paso anterior con anticuerpos monoclonales anti F4/80 y anti Ly6C.
6. Medición por medio de citometría de flujo de los subtipos de MO/MP que se encuentren en el tejido muscular inflamado.

7. **Obtención de una gráfica que muestre células Ly6C+ y F4/80+ (monocitos del subtipo inflamatorio) contra células Ly6C- y F4/80+ (monocitos del subtipo regenerativo).**