

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE RECAMBIO DE PROTEÍNAS PROTOTIPO DE MATRIZ
EXTRACELULAR EN REGENERACIÓN MUSCULAR DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DEL VENENO DE**

***Bothrops asper* O SUS TOXINAS AISLADAS”**

Lourdes María García Hernández

Erick Alexander Estrada Martínez

María Gabriela García Hernández

Química Biológica

Guatemala, agosto de 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE RECAMBIO DE PROTEÍNAS PROTOTIPO DE MATRIZ
EXTRACELULAR EN REGENERACIÓN MUSCULAR DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DEL VENENO DE
Bothrops asper O SUS TOXINAS AISLADAS”**

Presentado por

Lourdes María García Hernández

Erick Alexander Estrada Martínez

María Gabriela García Hernández

Para optar al título de

Química Biológica

Guatemala, agosto de 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
Msc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Proteínas (LAP) de la Unidad de Biología Celular, Departamento de Bioquímica, al Bioterio, Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, al Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, y a NeTropica (proyecto 01N-2010), por su valiosa colaboración en la realización de este estudio.

A nuestras asesoras, Licda. Rosario Hernández y Dra. Patricia Saravia, por guiarnos y enseñarnos este fascinante tema.

A nuestro revisor, Dr. Rubén Velásquez, por su apoyo y por el conocimiento que nos ha compartido.

Por último, a nuestras familias y amistades, por su apoyo incondicional que nos han mostrado a través de este viaje. Sin ustedes, esto no sería posible.

Índice

	Pág.
I. Ámbito de la Investigación.....	1
II. Resumen.....	3
III. Antecedentes	
A. Envenenamiento ofídico en Centro América.....	5
B. Componentes del veneno de <i>Bothrops asper</i>	7
1. Metaloproteinasas.....	8
2. Fosfolipasas A ₂	9
C. Fisiopatología del envenenamiento por <i>Bothrops asper</i>	9
1. Efectos locales	
a. Edema y dolor.....	10
b. Hemorragia y ampollas.....	11
c. Mionecrosis.....	11
2. Efectos sistémicos.....	12
3. Infecciones.....	12
D. Tratamiento del accidente ofídico.....	13
E. Matriz extracelular.....	15
1. Funciones de la matriz extracelular.....	15
2. Principales proteínas	
a. Fibronectina.....	17
b. Proteoglicanos.....	19
c. Colágeno.....	20
d. Laminina.....	21
3. Lámina basal.....	22
F. Regeneración del músculo esquelético.....	23
G. Matriz extracelular y regeneración muscular.....	25
H. Metaloproteinasas de matriz.....	27
I. Angiogénesis/Revascularización.....	29
J. Modelos de buena y mala regeneración muscular con toxinas de <i>Bothrops asper</i>	32
1. BaP1 y veneno completo (modelo de mala regeneración muscular).....	32
2. Miotoxinas PLA ₂ (Mtx) (modelo de buena regeneración muscular).....	33
IV. Justificación.....	34

V. Objetivos	
A. Generales.....	36
B. Específicos.....	36
VI. Materiales y Métodos	
A. Universo de trabajo.....	37
B. Muestra.....	37
C. Recursos	
1. Recursos humanos.....	37
2. Recursos institucionales.....	37
3. Recursos materiales	
a. Equipo.....	38
b. Materiales.....	38
c. Reactivos.....	38
D. Procedimiento	
1. Tratamiento.....	40
2. Procesamiento de muestras	
a. Homogenización en frío y almacenamiento de músculo.....	40
b. Cuantificación de proteínas.....	41
c. Inmunodetección de proteínas por Western Blot.....	41
E. Diseño estadístico.....	43
1. Análisis de resultados.....	43
VII. Resultados.....	45
A. Colágeno tipo IV.....	45
B. Fibronectina.....	48
VIII. Discusión de Resultados.....	51
IX. Conclusiones.....	58
X. Recomendaciones.....	59
XI. Referencias.....	60
XII. Anexos.....	68

I. Ámbito de la Investigación

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud pública relevante en la región latinoamericana, reportándose aproximadamente 500 casos anuales en Guatemala (Gutiérrez, 2010). La especie de serpiente que causa el mayor número de accidentes ofídicos es *Bothrops asper*, comúnmente conocida como barba amarilla, cuya mordedura causa edema, dolor, ampollas, hemorragias, isquemia y mionecrosis como efectos locales en el sitio de envenenamiento (Gutiérrez, 2009).

Existe tratamiento con suero antiofídico contra la mordedura de *B. asper*, sin embargo, los efectos locales de envenenamiento son rápidos, por lo que aún con el tratamiento, estos son solo parcialmente neutralizados, afectando el proceso de regeneración muscular (León, Valverde, Rojas, Lomonte, & Gutiérrez, 2000).

El veneno de serpientes se compone de una mezcla compleja de moléculas de diferente naturaleza bioquímica, siendo predominante la presencia de proteínas (Angulo & Lomonte, 2009). Estas incluyen enzimas y proteínas sin actividad enzimática. Entre las enzimas se encuentran serinas, metaloproteinasas dependientes de cinc, oxidasas y fosfolipasas; entre las proteínas sin actividad enzimática se encuentran las desintegrinas, lectinas tipo C, péptidos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP (*cistein-rich secretory protein*, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento endoteliales y vasculares e inhibidores de proteínasa tipo cistatina y Kunitz (Alape-Girón et al., 2009). En *B. asper*, los principales componentes del veneno son las metaloproteinasas y las fosfolipasas A₂, las cuales se encuentran en cantidades de 41 a 44 % y 29 a 45 %, respectivamente (Angulo & Lomonte, 2009).

Las fosfolipasas A₂ son componentes del veneno de *B. asper* que se caracterizan por producir mionecrosis sin hemorragia, ya que estas afectan la integridad de la membrana plasmática de las fibras musculares (Gutiérrez, Rucavado, Chaves, Díaz, & Escalante, 2009). Durante la ejecución del presente estudio se trabajó con una mezcla de fosfolipasas A₂ (PLA₂) miotóxicas, con y sin actividad enzimática, la cual se denomina en conjunto miotoxina o Mtx. Por otra parte, las metaloproteinasas son responsables de los efectos hemorrágicos locales, aun cuando no todas las

metaloproteinasas son capaces de inducir hemorragia. La inyección intramuscular de veneno puro de *B. asper* o las metaloproteinasas hemorrágicas purificadas BaH1 y BaP1 producen un rápido daño a la estructura de microvasculatura (Gutiérrez, et al., 2009). La metaloproteinasa BaP1 también produce proteólisis, dermonecrosis, ampollas y respuesta inflamatoria, siendo débilmente hemorrágica (Angulo & Lomonte, 2009). Estudios anteriormente realizados establecen que el proceso de regeneración muscular es más eficiente en músculos tratados con Mtx, razón por la cual se utiliza como un modelo de buena regeneración muscular; mientras que tanto el uso del veneno completo como la fracción metaloproteinasa hemorrágica BaP1 fue utilizado como modelos de mala regeneración muscular, ya que éstos producen una regeneración deficiente (Gutiérrez, 2009; Hernández et al., 2011).

Para que exista una correcta regeneración muscular, debe existir recambio de proteínas en la matriz extracelular (MEC), ya que esto promueve la remoción del desecho celular y secreción de moléculas como factores de crecimiento para dar paso a la regeneración del tejido (Grounds, 2008; Mott & Werb, 2004). En el presente trabajo se describe el patrón de recambio de fibronectina y colágeno tipo IV, ambas proteínas prototipo de matriz extracelular, en los modelos de buena y mala regeneración muscular mencionados anteriormente.

La información resultante contribuirá a la comprensión de los mecanismos implicados en la regeneración muscular luego del envenenamiento por *B. asper*, permitiendo propuestas de alternativas de tratamiento para la recuperación de la función del músculo afectado.

II. Resumen

La regeneración muscular deficiente es una secuela común al envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*. Se presenta como consecuencia de los principales efectos locales del veneno, tales como mionecrosis, hemorragia y edema. En este estudio se utilizó la inyección de una mezcla de fosfolipasas A₂miotóxicas (Mtx) o veneno completo de *B. asper* en el gastrocnemio de ratón, como modelos de buena y mala regeneración muscular respectivamente, con el fin de determinar el patrón de recambio de colágeno IV y fibronectina durante el proceso regenerativo.

El estudio se realizó durante los días 1 a 15 post inyección, ya que en esta ventana de tiempo se toman las decisiones celulares críticas para regeneración muscular. El patrón de recambio de estas dos proteínas prototipo de matriz extracelular se estudió utilizando la técnica de Western blot y un análisis semi-cuantitativo mediante densitometría. El patrón de recambio del colágeno IV en el modelo de buena regeneración demostró una disminución de la proteína los primeros 7 días después de la inyección, pero se recuperó alcanzando un valor cercano al del control normal en el día 15. Por el contrario, en el modelo de mala regeneración se observó la desaparición de la proteína durante los primeros 5 días y una leve recuperación hacia el día 15. En el caso de fibronectina, se observó que la cantidad de proteína nativa en los músculos inyectados con Mtx aumentó moderadamente los primeros 3 días y que hubo un aumento dramático a partir del día 5, que se mantuvo hasta el día 15, alcanzando un valor de 400% comparado con el control. Los músculos inyectados con veneno mostraron un patrón de recambio de fibronectina totalmente diferente, ya que se observó un aumento considerable en la cantidad de proteína detectada en los primeros 3 después de la inyección, hasta 350%, en comparación con el control. Su concentración disminuyó a niveles basales en el día 5 y mostró nuevamente un aumento moderado gradual hacia el día 15 del estudio. En ambos modelos se observó que conforme aumentaba la cantidad de fibronectina en su forma nativa, mayor era la cantidad de fragmentos proteolíticos de la proteína en el músculo en regeneración.

Se concluye que los patrones de recambio de ambas proteínas son completamente diferentes en los modelos estudiados, por lo que es necesario realizar estudios moleculares encaminados a elucidar los mecanismos responsables de la ausencia de síntesis de colágeno IV en el músculo

después de la inyección de veneno, identificar las isoformas de fibronectina presentes en el microambiente tisular generado por el envenenamiento para explicar las variaciones temporales en su concentración y el efecto que su concentración tan elevada en los primeros días del proceso regenerativo pudiera ejercer sobre la expresión del gen que la codifica (*Fn*).

III. Antecedentes

A. Envenenamiento ofídico en Centro América

Los envenenamientos por mordedura de serpiente representan un problema relevante en la salud pública en la región centroamericana, en la cual es posible encontrar una gran variedad de especies de serpientes. Estos accidentes ofídicos influyen en la morbilidad y mortalidad de la población, principalmente en trabajadores agrícolas (Gutiérrez, 2002, 2010).

El grupo más diverso de serpientes venenosas es el de la familia Colubridae, sin embargo, las especies de esta familia no causan envenenamientos serios en Centro América. Los casos más serios de envenenamiento por mordedura de serpiente son causadas por las familias Elapidae y Viperidae (Gutiérrez, 2010).

Las especies de la familia Elapidae pueden causar envenenamientos severos. En esta familia se incluyen las serpientes coral y las serpientes de mar. Un envenenamiento por una especie de la familia Elapidae puede resultar en manifestaciones neurotóxicas, debido a la acción de neurotoxinas alfa, presentes en el veneno, que actúan en la unión neuromuscular. Sin embargo, la incidencia de la mordedura de serpiente de coral es baja, representando solamente del 1 al 2% del número total de casos en la región centroamericana, mientras que ha habido muy pocos reportes de accidentes en Centro América involucrando a la serpiente de mar (Gutiérrez, 2010). Esto es debido a que la cantidad de veneno inyectada es poca y las serpientes no son agresivas, a menos que sean provocadas. Además, debido al pequeño tamaño de la boca de la serpiente, es muy difícil que estas serpientes ataquen a una persona, y en caso de una mordedura, éstas usualmente ocurren en los dedos (Gutiérrez, 1995).

Los accidentes ofídicos más importantes desde un punto de vista médico son causados por especies de la familia Viperidae, conocidas comúnmente como vipéridos (Gutiérrez, 1995). Existen 23 especies de vipéridos en la región, clasificados en los géneros *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothrops*, *Bothriechis*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Porthidium* (tabla 1) (Gutiérrez, 2010); de

los cuales los géneros *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis* se asocian con alteraciones fisiopatológicas inducidas por el veneno de la serpiente (Gutiérrez, 1995).

Tabla 1. Distribución de algunas especies de la familia Viperidae en Centro América

Especies	Guatemala	Belice	Honduras	El Salvador	Nicaragua	Costa Rica	Panamá
<i>Bothrops asper</i>	X	X	X		X	X	X
<i>Agkidostron bilineatus</i>	X	X	X	X	X	X	
<i>Atropoides mexicanus</i>	X		X		X	X	X
<i>Botriechis schlegelii</i>	X	X	X		X	X	X
<i>Cerrophidion godmani</i>	X		X	X	X	X	X
<i>Crotalus durissus</i>	X	X	X	X	X	X	
<i>Lachesis stenophrys</i>					X	X	X
<i>Porthidium nasutum</i>	X	X	X		X	X	X

Fuente: (Gutiérrez, Rucavado, & Escalante, 2010)

La especie que causa el mayor número de accidentes ofídicos en la región es *Bothrops asper* (Gutiérrez, 2010), lo cual se relaciona a su alta capacidad de adaptarse a los ambientes, lo que conlleva a su amplia distribución en áreas dedicadas a actividades agrícolas, y como consecuencia, a un mayor contacto de esta especie con las personas en ambientes rurales (Gutiérrez, 2009). Asimismo, *B. asper* es considerada una especie irritable y agresiva, y se caracteriza por su disposición a defenderse, por lo que tiende a atacar más que otros grandes vipéridos, los cuales retroceden cuando se les aproximan (Sasa, Wasko, & Lamar, 2009). La mayoría de envenenamientos por mordeduras de serpiente afectan a jóvenes trabajadores agrícolas, predominantemente hombres, que son mordidos mientras desempeñan sus labores (Gutiérrez, 2010).

En Costa Rica, las estadísticas hospitalarias indican que ocurrieron entre 500 a 600 casos de mordedura de serpiente por año durante la década de 1990 al 2000, lo cual corresponde a una incidencia de 15 casos por 100,000 habitantes por año (Gutiérrez, 2010). Datos epidemiológicos otorgados por las autoridades de salud en Panamá indican que existen cerca de 2,000 casos reportados por año, lo cual sugiere que Panamá es probablemente el país con una mayor incidencia de mordeduras por serpiente en la región. En cuanto a Nicaragua, Honduras y Guatemala, estos presentan un número de casos similares a Costa Rica, rondando los 500 casos al

año. No obstante, las cifras reales deben ser mayores, ya que un número indeterminado de casos no acuden a los centros hospitalarios. Por otro lado, en El Salvador la incidencia es menor, lo cual se debe principalmente al hecho que *B. asper* no se encuentra normalmente en el país (Gutiérrez, 2010).

Es importante mencionar que no todas las mordeduras de serpiente resultan en envenenamiento, ya que algunas mordeduras son causadas por especies no venenosas, e incluso en el caso de una mordedura de serpiente venenosa, existen casos en que el veneno no es inyectado en la persona (Gutiérrez, 2010). Existen hipótesis que sugieren que la alimentación de la serpiente es un factor importante para la inyección de veneno en una mordedura. Hayes (2003) probó que las serpientes que han sido privadas de comida por 28 días, inyectan menos veneno que una serpiente bien alimentada. Sin embargo, es necesaria la realización de más estudios para entender los mecanismos detrás de esta hipótesis (Hayes, Herbert, Rehling, & Gennaro, 2002).

B. Componentes del veneno de *Bothrops asper*

El veneno de los vipéridos está compuesto por una mezcla compleja de toxinas, enzimas, péptidos, nucleótidos, aminos biogénicas, carbohidratos, sales y ácidos orgánicos. Existe una particular relevancia en la presencia de muchas proteasas esterasas y fosfolipasas A₂ que son responsables de una variedad de efectos farmacológicos (José María Gutiérrez, 1995). Un análisis proteómico ha revelado la presencia de las siguientes proteínas en el veneno de *B. asper*: metaloproteinasas (41 a 44 %), fosfolipasas A₂ (29 a 45 %), serino-proteinasas (4 a 18 %), L-aminoácido oxidasa (5 a 9 %), desintegrinas (1 a 2 %), lectina tipo C (.5 %), y otros (< .1 %) (Angulo & Lomonte, 2009).

1. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas del veneno de serpiente (SVMP, por sus siglas en inglés) son componentes abundantes en los venenos de éstas, especialmente en aquellos de las familias Viperidae y Colubridae. Las SVMPs desempeñan un papel importante en el envenenamiento debido a que inducen una compleja serie de efectos fisiopatológicos locales y sistémicos. En el sitio de inyección, las SVMP inducen hemorragia, edema, mionecrosis, ampollas, dermonecrosis y una prominente reacción inflamatoria (Gutiérrez et al., 2010).

Las SVMPs se clasifican, desde el punto de vista estructural, en cuatro grupos, en base a los dominios que poseen (Gutiérrez, 2002). En el veneno de *B. asper* se ha demostrado la presencia de las clases P-I, P-II y P-III, pero sólo se han podido aislar los grupos P-I y P-III (Angulo & Lomonte, 2009).

La versión más simple de SMVPs comprende la clase P-I, la cual incluye precursores que contienen una secuencia señal seguida de un pro-dominio, y un dominio de metaloproteinasa. Las SMVPs de clase P-II comprenden, además del pro-dominio y el dominio de metaloproteinasa, tienen un dominio de desintegrinas, el cual está conectado al dominio de metaloproteinasa. La clase P-III comprende de un pro-dominio, un dominio de metaloproteinasa, un dominio de desintegrinas, y un dominio rico en cisteína. La clase P-IV comprende, además de los dominios de la clase P-III, subunidades adicionales constituidas por dominios de lectina C anclados por enlaces disulfuros a la cadena principal de proteínasa (Gutiérrez et al., 2010). La presencia de estos dominios adicionales le confiere a las metaloproteinasas la capacidad de reconocer diferentes clases de receptores (Gutiérrez, 2002).

Se han aislado cinco metaloproteinasas hemorrágicas del veneno de *B. asper*: BaH1, BH2, BH3, BH4 y BaP1; de las cuales la más abundante es la BaP1, perteneciente desde un punto de vista molecular al grupo P-I (Angulo & Lomonte, 2009; Teixeira, Cury, Moreira, Picolo, & Chaves, 2009). La BaP1 comparada con las otras toxinas hemorrágicas del veneno, tiene una actividad hemorrágica débil; sin embargo, contribuye al desarrollo del daño tisular local, ya que participa en la inflamación, mionecrosis y alteraciones de la matriz extracelular (Rucavado, Lomonte, Ovadia, & Gutiérrez, 1995).

2. Fosfolipasas A₂

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂, por sus siglas en inglés) forman un grupo de componentes del veneno que tienen un amplio rango de efectos farmacológicos desde daño a la membrana, inhibición a la coagulación sanguínea, hemólisis y mionecrosis, dependiendo de la PLA₂ que se encuentre presente en el veneno (Meier & Stoker, 1995).

El veneno de *B. asper* contiene una proporción significativa de enzimas PLA₂ tanto ácidas como básicas. Las PLA₂ básicas son más abundantes que las ácidas en el veneno de *B. asper*. Se ha demostrado que todas ellas producen daño en el músculo esquelético minutos después de su inyección intramuscular en ratones. Este grupo de proteínas es conocido comúnmente como miotoxinas PLA₂ (Mtx) y se ha verificado que estas son los principales componentes responsables de la mionecrosis en envenenamientos por esta especie (Angulo & Lomonte, 2009).

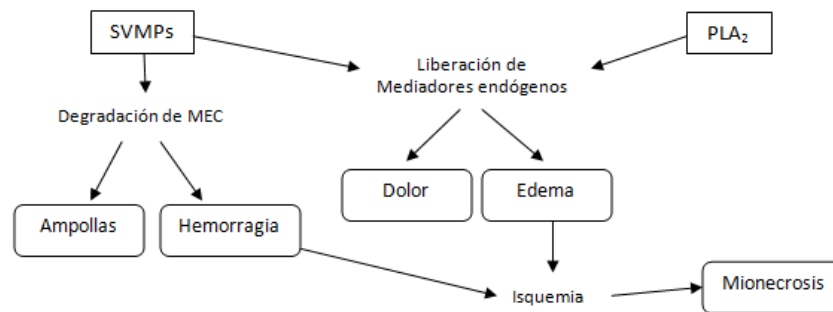
Los estudios de las secuencias de estas miotoxinas han permitido dividir las en dos subtipos: aquellas que presentan aspartato en el residuo 49 (Asp49) y las que presentan lisina en dicha posición (Lis49). Esta diferencia tiene implicaciones drásticas en la catálisis, ya que el aspartato en el residuo 49 juega un papel central en la capacidad de estas proteínas de unir el ion calcio, el cual es requisito para la actividad catalítica. La sustitución del aspartato por lisina tiene como consecuencia una incapacidad de la molécula para ligar calcio y, por lo tanto, conlleva a la pérdida de la actividad enzimática. El grupo de Lis49, a pesar de ser inactivas enzimáticamente, posee una fuerte acción miotóxica, por lo que existen evidencias que las responsables de la acción miotóxica son otras regiones moleculares diferentes del sitio catalítico (Gutiérrez, 2002).

C. Fisiopatología del envenenamiento por *Bothrops asper*

Los envenenamientos por *B. asper* se caracterizan por una prominente y compleja serie de alteraciones patológicas locales que aparecen rápidamente luego de la mordedura en el sitio anatómico donde el veneno fue inyectado (fig. 1) (José María Gutiérrez, 2009).

Existe una variedad de factores que determinan la severidad del envenenamiento, así como el tiempo de desarrollo de los signos y síntomas, como por ejemplo: a) la cantidad de veneno inyectado, *B. asper* es capaz de inyectar relativamente un gran volumen de veneno, siendo capaz de provocar severos envenenamientos (Gutiérrez, 2009); b) el número de mordeduras y la ruta de inyección del veneno, la mayoría de accidentes por vipéridos son a consecuencia de una única mordedura y el veneno es inyectado por vía intramuscular o subcutánea; y c) la condición de la víctima, no sólo en términos de altura y peso, sino también de su estado de salud general (Gutiérrez, 1995).

Figura 1. Efectos locales producidos por el venenos de *B. asper*



Fuente: (Gutiérrez, Rucavado, et al., 2009)

1. Efectos locales

a. Edema y dolor

El edema local es una de las consecuencias comunes en envenenamientos por vipéridos en Centro América (Gutiérrez, 1995), y tiene un origen multifactorial ya que puede ser debido a: 1) la acción directa de toxinas hemorrágicas en la microvasculatura, actuando principalmente sobre las células endoteliales, con una consecuente extravasación; y 2) por la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, como la histamina, óxido nítrico, citosinas y metaloproteinasas de matriz, que inducen a un aumento en la permeabilidad vascular (Gutiérrez, 2009, 2010).

El dolor se debe a la acción de varios mediadores endógenos liberados en los tejidos (bradiquinina y leucotrienos) que actúan en fibras nerviosas aferentes induciendo hiperalgesia y alodinia (Gutiérrez, 2010).

b. Hemorragia y ampollas

La inyección intramuscular o subcutánea del veneno resulta en un daño agudo de la piel provocando hemorragias (locales y sistémicas) y aparición de ampollas, las cuales son dos consecuencias comunes de envenenamiento por vipéridos (Gutiérrez, 1995, 2002, 2010). Las hemorragias son causadas por la acción de toxinas hemorrágicas presentes en el veneno de la serpiente, pertenecientes a la familia de metaloproteinasas dependientes de zinc, las cuales degradan los componentes de la lámina basal, debilitando la estabilidad mecánica de la pared de los capilares y vénulas, con una consecuente extravasación (Gutiérrez, 2002, 2010). La principal consecuencia de una hemorragia severa es hipovolemia y shock cardiovascular, complicación muy común en envenenamiento severos por vipéridos en Centro América (Gutiérrez, 1995).

Por otro lado, la formación de ampollas se debe a las metaloproteinasas. Éstas son las responsables de la hidrólisis de componentes en la unión entre dermis y epidermis resultando en la separación de la dermis (Gutiérrez, 2010).

c. Mionecrosis

La mionecrosis provocada por envenenamiento de serpiente en la región centroamericana se debe principalmente a la acción de Mtx (Gutiérrez, 1995). Se ha demostrado que estas miotoxinas afectan directamente la integridad de la membrana plasmática de las células musculares por medio de una hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, originando un influjo de calcio hacia el citosol, lo cual pone en marcha una serie de eventos degenerativos que culminan con lesión celular irreversible (Gutiérrez, 2002).

2. Efectos sistémicos

En casos moderados y severos de envenenamiento por vipéridos, la distribución del veneno produce manifestaciones sistémicas, las cuales están caracterizadas por náusea, mareos, fiebre, vómitos, hipotensión, hemoptisis, hematuria, oliguria, sangrado de las encías, coagulopatías, shock hipovolémico y falla renal (Gutiérrez, 1995, 2010).

El envenenamiento por la mordedura de *B. asper* es caracterizado principalmente por alteraciones locales (Gutiérrez, 2009), por lo cual no se verán en detalle los efectos sistémicos que causa esta especie.

3. Infecciones

La formación de abscesos es una complicación común presentada en pacientes que han sido mordidos por serpientes de la familia Viperidae en Latinoamérica. Las infecciones tisulares luego de la mordedura de serpiente del género *Bothrops* han sido atribuidas a varios componentes del veneno, cuya acción puede crear un ambiente favorable para la multiplicación de bacterias (Saravia-Otten, Gutiérrez, Arvidson, Thelestam, & Flock, 2007).

Luego de su recorrido por el conducto de veneno y los colmillos, además de las bacterias presentes en la piel del paciente, el veneno de serpiente se convierte en un fluido muy contaminado, conteniendo abundantes bacterias (Gutiérrez, 2009, 2010). La acción miotóxica en los tejidos y las toxinas hemorrágicas en el veneno de *B. asper* afecta drásticamente las proteínas de la matriz extracelular, los vasos sanguíneos, y las fibras musculares, por lo que se cree que estos componentes contribuyen a la habilidad de *Staphylococcus aureus* de causar una infección. Como consecuencia, una infección puede complicar los efectos patológicos locales que son iniciados por los componentes del veneno (Gutiérrez, 2010; Saravia-Otten et al., 2007).

D. Tratamiento del accidente ofídico

Cualquier paciente con evidencia de envenenamiento o que haya sido mordido por una serpiente debe ser considerado como una emergencia médica y debe ser tratado como tal. Todos los casos de mordedura de serpiente deben ser admitidos en un centro de salud y ser observados periódicamente (Gutiérrez, 1995).

La meta principal en el diagnóstico es averiguar si la mordedura fue causada por un vipérido, una serpiente coral o una serpiente no venenosa. Debido a que las mordeduras por serpiente coral no se caracterizan por efectos locales, en Centro América la evidencia de un daño tisular implica que el paciente fue mordido por un vipérido (Gutiérrez, 1995).

Si un paciente muestra signos de envenenamiento se recomienda administrar una dosis inicial de un suero antiofídico, tan pronto como sea posible. No se recomienda el uso del antiofídico en el campo, fuera de un centro de salud. En estas condiciones, normalmente el antiofídico es inyectado intramuscularmente, por lo que su acción es menos eficaz que si fuera inyectado por vía intravenosa. Además, existe un riesgo de reacciones adversas al antiofídico, tales como reacciones anafilácticas y anafilactoideas, las cuales son difíciles de tratar en el campo (Gutiérrez, 1995, 2010).

Los antisueros terapéuticos usados actualmente para el tratamiento de pacientes envenenados por *B. asper* son polivalentes y consisten en moléculas nativas de IgG o preparaciones de fragmentos $F(ab')_2$ obtenidas de animales hiperinmunizados con una mezcla de venenos de diferentes especies de *Bothrops*. El Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” en Ecuador produce un suero antiofídico, así como el Centro Nacional de Producción de Biológicos (Instituto Nacional de Salud, Perú) fabrica un suero antibotrópico. También podemos mencionar al Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia, el cual produce un suero polivalente antibotrópico, entre otros (Alape-Girón et al., 2009).

El Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica, Costa Rica) fabrica dos importantes antiofídicos para la región centroamericana: un antisuero polivalente, el cual es efectivo contra

todos los venenos de la familia Viperidae; y el antisuero anticoral, efectivo contra el veneno de las especies más importantes de la familia Elapidae. Estos son antisueros equinos de inmunoglobulina G (IgG), y se ha demostrado que son capaces de neutralizar el veneno de las especies venenosas de Centro América (Gutiérrez, 1995, 2010). Se ha observado que existe una variabilidad en las actividades enzimáticas y tóxicas del veneno de *B. asper* dependiendo de su origen geográfico, por lo que los antisueros fabricados en una región, pueden no ser efectivos en una región diferente (Alape-Girón et al., 2009).

La dosis del antiofídico debe ser establecida para cada antiofídico en particular, respaldándose en estudios preclínicos y pruebas clínicas (Gutiérrez, 2010).

En algunos casos puede ser necesaria una segunda dosis del antisuero, dependiendo de la evolución de los signos locales y sistémicos, los síntomas y si existe evidencia que el envenenamiento no ha sido controlado. Los envenenamientos por vipéridos en Centro América, el número de viales de antisuero requerido para un tratamiento puede ser de 4 en casos leves, hasta 20 viales en casos muy severos (Gutiérrez, 1995).

En contraste con la buena neutralización de los efectos sistémicos, los efectos locales inducidos por el veneno de *B. asper* son solo parcialmente neutralizados con el uso del antiofídico (Lomonte, León, Angulo, Rucavado, & Núñez, 2009).

Estudios realizados apoyan que la ruta óptima de la administración del antisuero debe ser por vía intravenosa, tanto para efectos locales como sistémicos, ya que si se administra por vía intramuscular en el mismo sitio en el que el veneno fue inyectado se observa una menor habilidad de reducir los daños tisulares locales producidos (Lomonte et al., 2009).

El correcto manejo de un caso por mordedura de serpiente se debe basar tanto en la clínica como en los hallazgos de laboratorio (Gutiérrez, 2010). En el caso de un accidente por un vipérido se deben realizar pruebas de laboratorio como: pruebas de coagulación (TTP, TP), hematología completa con recuento de plaquetas (describe un envenenamiento sistémico), y la medición de niveles séricos de varias enzimas como la creatina quinasa y la lactato deshidrogenasa (monitoreo

de daño al tejido) (Gutiérrez, 1995, 2010). El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo parcial de tromboplastina (TTP) se encuentran prolongados en el envenenamiento por vipéridos (valores normales: TP 10-15 s; TTP 20-45 s). En envenenamientos sistémicos se han descrito casos con trombocitopenia (valor normal: 150,000-450,000 plaquetas/mm³). Otras alteraciones hematológicas en envenenamiento por vipéridos incluyen una leucocitosis (valor normal: 4,000-11,000 leucocitos/mm³) y una neutrofilia (valor normal: 50 a 70%) moderadas (Gutiérrez, 1995).

E. Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es un complejo macromolecular dinámico el cual se está remodelando constantemente, y constituye una proporción significativa de cualquier tejido. Esta matriz es sintetizada localmente, y se ensambla formando una malla que rodea las células (Abbas, Robbins, Fausto, & Mitchell, 2008).

La MEC está compuesta por una compleja red de moléculas insolubles, las cuales se agrupan en tres clases: a) proteínas estructurales como colágenos y elastinas que aportan resistencia y flexibilidad a la matriz; b) complejos proteínas-polisacárido denominados proteoglicanos que constituyen la matriz en la que se insertan las moléculas estructurales y c) glucoproteínas de adhesión, tales como la fibronectina y la laminina, que anclan las células a la matriz (Becker, Kleinsmith, & Hardin, 2007; Mott & Werb, 2004).

1. Funciones de la matriz extracelular

La matriz extracelular es un componente importante del tejido, ya que regula la proliferación, movimiento y diferenciación de células que se encuentran en su interior, ya que aporta un sustrato para la adhesión celular y sirve como reservorio de factores de crecimiento (Abbas et al., 2008). Así, la MEC cumple con muchas funciones, entre las cuales se encuentran:

- Sostén mecánico para el anclaje de la célula y la migración celular, y mantenimiento de la polaridad celular.

- Control del crecimiento celular. Los componentes de la MEC pueden regular la proliferación celular señalizando a través de receptores celulares de la familia de las integrinas.
- Mantenimiento de la diferenciación celular. El tipo de las proteínas de la MEC puede afectar al grado de diferenciación de las células del tejido, actuando también en gran medida por medio de las integrinas de superficie.
- Andamiaje para la renovación tisular. El mantenimiento de la estructura tisular normal requiere una membrana basal o andamiaje estromal. La integridad de la membrana basal o el estroma de las células parenquimatosas es crítica para la regeneración organizada de los tejidos. Es particularmente llamativo que, aunque las células lábiles y estables sean capaces de regeneración, la lesión de estos tejidos da lugar a la restitución de una estructura normal sólo si la MEC no está dañada. Los trastornos en estas estructuras llevan al depósito de colágeno o a la formación de cicatriz.
- Establecimiento de microambientes tisulares. La membrana basal actúa como frontera entre el epitelio y el tejido conjuntivo situado por debajo y forma también parte del aparato de filtración del riñón.
- Almacenamiento y presentación de moléculas reguladoras. Por ejemplo, los factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), son excretados y almacenados en la MEC, en algunos tejidos. Se permite, de este modo, la utilización rápida de factores de crecimiento después de la lesión local o durante la regeneración.
- Soporte estructural de la célula, reservorio de citosinas y factores de crecimiento. (Abbas et al., 2008; Mott & Werb, 2004)

2. Principales proteínas

a. Fibronectina

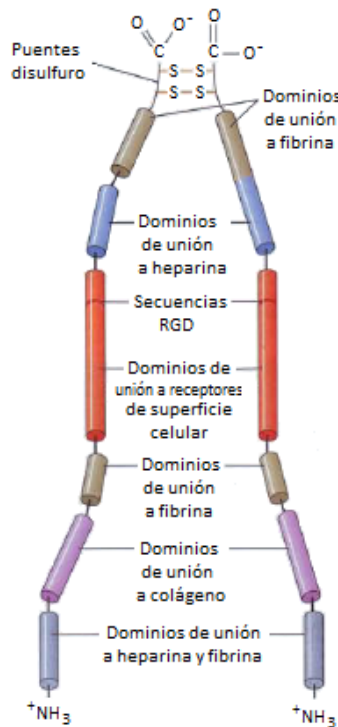
La fibronectina es una clase importante de proteína no colágena multiadhesiva, la cual se encuentra de forma soluble en la sangre y otros fluidos del cuerpo y como fibrillas insolubles en la matriz extracelular (Becker et al., 2007; Grounds, 2008; Lodish et al., 2004). La fibronectina es producida luego de la transcripción de un solo gen compuesto de 47 exones (White, Baralle, & Muro, 2008). Se han observado hasta 20 variantes de esta proteína en humanos, cuya diversidad es obtenida por un empalme alternativo de 2 exones tipo III llamados Extra Dominio A y B (EDA y EDB, respectivamente) (White & Muro, 2011). Las dos isoformas de la fibronectina (plasmática y celular) difieren en la presencia de estos dominios: la fibronectina plasmática no contiene las secuencias alternativas EDA y EDB, mientras que la fibronectina celular contiene proporciones variables de estos dominios (White & Muro, 2011).

La función principal de la fibronectina es la fijación de células a todas las matrices que contienen colágeno fibroso (tipos I, II, III, y V). Por sus uniones, la fibronectina regula la forma de las células y la organización de su citoesqueleto; también es esencial para la migración y la diferenciación de muchos tipos celulares durante la embriogénesis, sirviendo como caminos que facilitan la migración de células o como repelentes que mantienen a las células fuera de áreas prohibidas (Alberts et al., 2008; Lodish et al., 2004). Además, es importante para la cicatrización y la migración de otras células inmunitarias hacia la zona afectada (Lodish et al., 2004). También cabe mencionar que la fibronectina juega un papel en el proceso de coagulación sanguínea (Lodish et al., 2004). Los dominios EDA y EDB son abundantes en etapas embriogénicas, lo que sostiene la hipótesis que tienen un rol importante durante la embriogénesis y el desarrollo vascular, la migración y diferenciación celular. Estos dominios se presentan escasamente en tejidos adultos, pero son expresados en condiciones específicas como reparación del tejido, angiogénesis, fibrosis del tejido y migración celular (White & Muro, 2011).

La propiedad de multiadhesión de la fibronectina se origina en la presencia de múltiples dominios de sitios de unión con elevada afinidad para colágeno y otros componentes de la MEC, así como a ciertas integrinas en la superficie de células (Becker et al., 2007; Lodish et al., 2004).

La fibronectina es un dímero de gran tamaño (450 kD) compuesto de dos largas subunidades unidas por enlaces disulfuro en un extremo. Cada subunidad se encuentra plegada en una serie de diferentes dominios funcionales (Abbas et al., 2008; Alberts et al., 2008). Varios de los dominios reconocen y unen a una o más clases específicas de macromoléculas localizadas en la MEC o sobre la superficie celular, incluyendo varios tipos de colágeno (I, II, y IV). La capacidad de estos dominios para la unión al receptor se ha localizado en una secuencia tripeptídica específica (Arg-Gly-Asp, o RGD) (fig. 2) (Becker et al., 2007).

Figura 2. Estructura de la fibronectina



Fuente: (Becker et al., 2007)

Varias proteínas extracelulares además de la fibronectina tienen una secuencia RGD que media la unión en la superficie celular. Los receptores de superficie celular que unen las proteínas que contienen la secuencia RGD son miembros de la familia de las integrinas (Alberts et al., 2008).

b. Proteoglucanos

Los proteoglucanos están conformados por polisacáridos, los cuales son largos polímeros lineales repetidos de disacáridos específicos, denominados glucosaminoglucanos (GAG). Los GAGs son llamados así debido a que uno de los dos azúcares en su secuencia es siempre un amino azúcar, que en la mayoría de los casos está sulfatado (Alberts et al., 2008; Lodish et al., 2004). Los proteoglucanos se destacan por su diversidad, ya que es posible encontrarlos en la matriz extracelular y en la superficie de muchas células (Lodish et al., 2004).

Los GAGs se clasifican en base a la naturaleza de la secuencia de los disacáridos que lo conforman y el número y ubicación del grupo sulfato: heparán, condroitín, dermatán, y queratán, se encuentran sulfatados, mientras que el hialuronato no se encuentra sulfatado (Alberts et al., 2008; Lodish et al., 2004; Rosso, Giordano, Barbarisi, & Barbarisi, 2004).

El peso de los GAGs en el tejido conectivo es usualmente menor del 10% del peso de las proteínas fibrosas. Pero debido a su capacidad a formar geles porosos hidratados, las cadenas de GAGs llenan la mayor parte del espacio extracelular (Alberts et al., 2008). Debido a las cargas negativas por la presencia de grupos carboxilo y sulfato, los proteoglucanos pueden enlazarse a numerosos cationes, que a su vez arrastran abundantes moléculas de agua. Como resultado, los proteoglucanos forman un gel poroso hidratado que actúa como material de empaque para resistir fuerzas de compresión (Becker et al., 2007; Karp, 2009).

Los proteoglucanos son tan diversos en función como lo son estructural y químicamente. Estos tienen un rol importante en la señalización química entre las células. Ellos unen varias moléculas de señalización que han sido secretadas, controlando su difusión a la matriz, su rango de acción, y su vida media, así como ayudan a mejorar o inhibir su actividad. Asimismo, actúan como reguladores de tráfico de moléculas y células de acuerdo a su tamaño y carga, ya que los GAGs son capaces de formar geles de un tamaño variable de poros y densidad de carga (Alberts et al., 2008).

c. Colágeno

El colágeno es la principal proteína fibrosa insoluble de la matriz extracelular y el tejido conectivo. De hecho, es la proteína individual más abundante del reino animal, constituyendo el 25% de la masa total proteica (Alberts et al., 2008; Lodish et al., 2004). Existen por lo menos 16 tipos de colágeno distribuidos en el organismo (tabla 2), sin embargo del 80 al 90% de éste se compone de los tipos I, II y III. El colágeno tipo IV forma un retículo bidimensional fibroso básico de todas las láminas basales (Lodish et al., 2004).

Tabla 2. Algunos tipos de colágeno y su distribución en el organismo

Tipo de colágeno	Tejidos representativos
Colágenos fibrilares	
I	Piel, tendones, huesos, ligamentos, dentina, tejidos intersticiales
II	Cartílago, humor vítreo
III	Piel, músculo, vasos sanguíneos
V	Córnea, dientes, huesos, placenta, piel, músculo liso
Colágenos asociados a fibrillas	
VI	La mayoría de tejidos intersticiales
IX	Cartílago, humor vítreo
Colágenos formadores de laminas y de anclaje	
IV	Todas las láminas basales
VII	Debajo de la lámina basal de la piel
XV	Ubicuo; cerca de la lámina basal en músculo
Colágenos de transmembrana	
XIII	Hemidesmosomas en la piel
XVII	Hemidesmosomas en la piel

Fuente: (Lodish et al., 2004)

Las moléculas del colágeno tipo IV, con un peso de 300 kDa (Viladot, 2001), consisten en tres cadenas proteicas que se enrollan para formar una hélice, la cual está interrumpida en más de 20 regiones, lo que permite múltiples dobleces. Las moléculas de colágeno tipo IV interactúan por

medio de sus dominios terminales para ensamblarse extracelularmente en una red flexible. Es de esta manera que el colágeno tipo IV da a la lámina basal fuerza tensora (Lodish et al., 2004). Las láminas basales son láminas de apoyo muy delgadas y las moléculas de colágeno tipo IV se organizan formando una red aplanada que sirve como estructura para el depósito de otros materiales extracelulares (Karp, 2009).

El colágeno tipo IV, uno de los mayores componentes de la membrana basal, contiene receptores para interactuar con la superficie celular, así como sitios de unión para laminina, heparán sulfato y nidogen (Carmignac & Durbeej, 2012).

d. Laminina

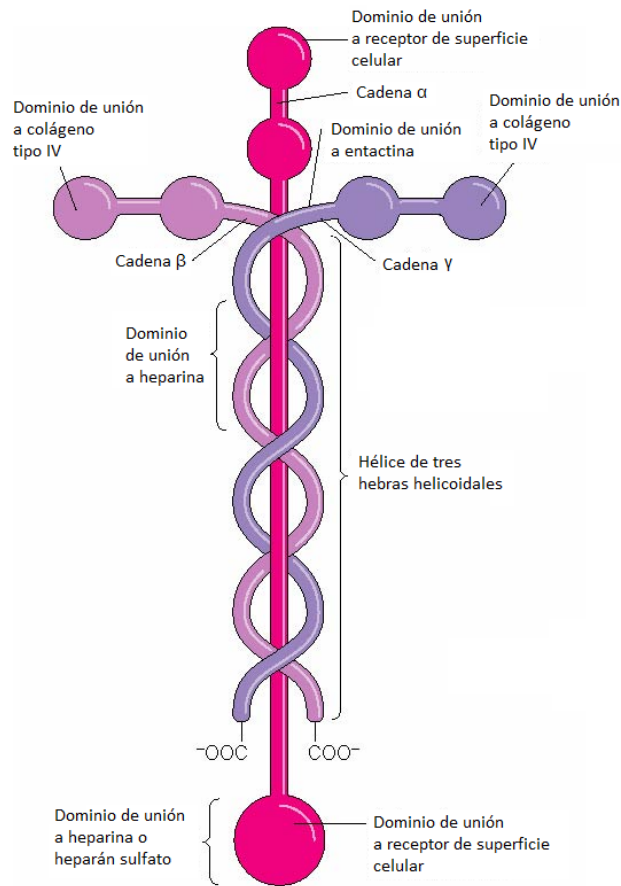
La laminina es una larga proteína flexible compuesta por tres cadenas polipeptídicas (α , β y γ) unidas por enlaces disulfuro, cuyo peso molecular es 820 kD (Abbas et al., 2008; Alberts et al., 2008).

La laminina es una importante glucoproteína de adhesión presente en la MEC (Becker et al., 2007). Después del colágeno tipo IV, la laminina es el constituyente más destacado de todas las láminas basales (Alberts et al., 2008). Se han caracterizado por lo menos cinco cadenas α , tres cadenas β y tres cadenas γ , formando hasta 15 isoformas diferentes (Carmignac & Durbeej, 2012).

La laminina es una proteína con forma de cruz, de longitud equivalente al espesor de la lámina basal. Al igual que la fibronectina, la laminina contiene dominios distintos con sitios de enlace específicos (fig. 3) (Karp, 2009). La laminina posee sitios de unión de afinidad elevada para otros componentes de la lámina basal, por ejemplo el colágeno tipo IV, así como para proteínas receptoras de laminina situada en la superficie de células adyacentes (Becker et al., 2007; Lodish et al., 2004).

Además de mediar en la unión a la membrana basal, la laminina puede también modular la proliferación, diferenciación y motilidad celulares (Abbas et al., 2008).

Figura 3. Estructura de la laminina



Fuente: (Becker et al., 2007)

3. Lámina basal

La lámina basal es una delgada capa de material extracelular especializado que se sitúa por debajo de las células epiteliales, y que por tanto, las separa del tejido conectivo. Además, la lámina basal rodea a las células musculares, los adipocitos y las células de Schwann que forman las envolturas de mielina alrededor de las células nerviosas (Becker et al., 2007).

Los principales componentes de la lámina basal son colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos ricos en heparán sulfato, perlecán, y entactina, una proteína pequeña multiadhesiva de la matriz que interactúa con la laminina y el colágeno tipo IV (Carmeli, Moas, Reznick, & Coleman, 2004;

Lodish et al., 2004). La fibronectina puede o no estar presente en la lámina basal (Becker et al., 2007).

Se piensa que la laminina está localizada principalmente en la superficie de la lámina orientada hacia las células epiteliales que están por encima, ayudando a unir células a la lámina basal. La fibronectina, por otra parte, se localiza en la otra cara de la lámina, donde ayuda a anclar células del tejido conectivo (Becker et al., 2007). Las múltiples interacciones entre estos componentes estabilizan la estructura global de la lámina basal (Lodish et al., 2004).

La lámina basal proporciona un soporte estructural para las miofibrillas del músculo esquelético y es importante en el mantenimiento de la integridad fisiológica de las mismas. Además, sirve también como una barrera selectiva para electrolitos. La lámina basal tiene su papel principal en la reparación de las fibras musculares después de un daño o ejercicio excesivo (Carmeli et al., 2004).

F. Regeneración del músculo esquelético

Las propiedades funcionales del músculo esquelético dependen del mantenimiento de miofibrillas, neuronas motoras, vasos sanguíneos y la matriz extracelular, razón por la cual tras una lesión muscular es necesaria la activación de un conjunto de respuestas celulares que resultan en la revascularización y reconstitución de la matriz extracelular, aspectos esenciales en el proceso de regeneración muscular. A pesar de la amplia investigación realizada en este campo, las complejas vías de regulación permanecen sin ser entendidas en su totalidad (Chargé & Rudnicki, 2004).

Una vez que el daño del músculo esquelético ha progresado a la necrosis de la miofibrilla, ocurre la secuencia usual de eventos para la reparación. Esta secuencia incluye inflamación y fagocitosis del debris celular dentro de los primeros días; revascularización y miogénesis con la formación de un nuevo músculo (usualmente completado entre los 7 a 10 días después del daño), y la subsiguiente maduración, inervación y restauración de la función que puede tomar meses (Grounds, 2008).

El proceso de regeneración muscular se caracteriza por la presencia de dos fases sucesivas: una fase degenerativa donde se inducen inflamación y necrosis de las miofibras afectadas; y una fase regenerativa donde se producen la proliferación, diferenciación, elongación y fusión de mioblastos en miofibros. La fase temprana de la lesión muscular va acompañada de la activación de células mononucleadas, principalmente células inflamatorias, seguido de la necrosis de las fibras musculares. Este evento se provoca por la ruptura del sarcolema de las células musculares resultando en el incremento de la permeabilidad de las miofibrillas. Estas dos son las características fisiopatológicas principales que se producen en el sitio de la lesión muscular (Chargé & Rudnicki, 2004).

La degeneración muscular es seguida de la activación de un proceso de regeneración tisular, dentro del cual un evento importante es la proliferación celular, específicamente proliferación de células satélite. Las células satélites son una población indiferenciada de células miogénicas que se encuentran en un estado mitótico quiescente y se encuentran localizadas entre la lámina basal y el plasmalema. La activación de células musculares satélites resulta un importante paso en la habilidad del músculo para regenerarse, ya que se ha observado en modelos animales que sin la buena proliferación de estas células, la regeneración muscular se ve drásticamente reducida (Chargé & Rudnicki, 2004; Ciciliot & Schiaffino, 2010).

Durante la regeneración muscular, en su fase inicial, las células satélite salen de su estado normal quiescente para empezar a proliferar. Después de varios ciclos de proliferación, la mayoría de las células satélite se diferencia y fusiona para formar nuevas miofibras o se unen a una preexistente para repararla. Después de la proliferación, se restablece el pool de células satélite en estado quiescente para posteriores procesos regenerativos. Este proceso está regulado por factores de regulación miogénica (MRF) en las diversas etapas de regeneración, como por ejemplo; MRF MyoD y Myf5 se han relacionado con el proceso de proliferación y diferenciación de las células satélites; mientras que los factores MRF, Miogenina y MRF4 se han visto relacionados en la fase terminal de diferenciación. Sin embargo, como se había expresado anteriormente, las complejas vías de regulación permanecen sin ser entendidas en su totalidad. Este proceso es similar al observado durante la miogénesis embrionaria (Chargé & Rudnicki, 2004; Ciciliot & Schiaffino, 2010).

G. Matriz extracelular y regeneración muscular

La compleja red de interacciones que ocurren en la MEC son de importancia en el funcionamiento normal del músculo esquelético, ya que defectos en alguno de sus componentes conllevan a la ruptura y debilitamiento de este (Grounds, 2008). La estructura y composición molecular de la MEC en una miofibrilla es compleja, con una variedad de proteínas que pueden demostrar un cambio en la composición cuando se da la regeneración muscular, como se demuestra en la tabla 3 (Grounds, 2008).

Tabla 3. Composición y estructura de la MEC en músculo esquelético

Molécula	# formas	Formas en el músculo esquelético	ECM intersticial	Membrana basal
Colágeno	27	I, IV, VI, XV, XVIII, IX, XI	I	IV y VI Generalmente no se encuentra en la MB madura, pero puede aparecer luego de daño
Fibronectina	3			
Tenascina	4	C, X(Y), R, J1	Tenascina C generalmente baja, pero aumenta luego de un daño	Probablemente aparece luego de daño
Laminina	16	211, 221, 411, 421, 511, 521		Principalmente laminina 211
		Condroitín sulfato: Biglicano, versicano, decorin	Abundante	Versican
		Dermatán sulfato		
GAGs	Muchas	Heparán sulfato: Perlecán, sindecan, glicipán-I, agrin	Abundante	Abundante en perlecán, sindecan-1, 3, 4, glipican-1 y agrin
		Hialuronato		
Galetinas	14			Gal-1
Proteasas	Muchas	MMP's, RECKS, TIMPs, tripsina, trombina, calpaina	MMP-2 (MMP-9 aumenta luego de daño)	

Notas:

- Otras moléculas pueden estar presentes, a menudo en menor cantidad
- La composición de la MEC intersticial varía entre endomisio, perimisio y epimisio

Fuente: Adaptado de (Grounds, 2008)

En el músculo esquelético, la isoforma de laminina mayoritariamente presente se compone de cadenas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$, formando la laminina 211. En la MEC del músculo esquelético también se puede encontrar α -dístroglicano, miembro del complejo de dístrofinas-glicoproteínas (DGC, por sus siglas en inglés), que son un complejo de proteínas asociadas a la membrana. Éstas cumplen la función crítica de proteger la integridad de las fibras musculares. EL DGC provee una unión entre la MEC y el citoesqueleto y se cree que protege la fibra muscular de daños provocados por contracción. Otras proteínas que forman dicho complejo son β -dístroglicano, dístrofina, sarcoglicanos (α , β y γ), sarcospano, sintropinas ($\alpha 1$, $\beta 1$) y α -dístrobrevína (Carmignac & Durbeej, 2012).

La MEC actúa como reservorio de diversas moléculas que son secretadas y actúan principalmente de forma extracelular (Grounds, 2008; Mott & Werb, 2004). Entre estas moléculas podemos mencionar citosinas y factores de crecimiento, entre otros, las cuales desempeñan un papel importante tanto en el mantenimiento y remodelación de la MEC, como en el proceso de regeneración de un tejido. Por otro lado, la MEC influye en el comportamiento celular, ya que ésta mantiene una estrecha relación con las mismas (Mott & Werb, 2004).

Para mantener la integridad funcional de las miofibrillas en el músculo esquelético es necesario el rompimiento de la MEC, ya que con ello se regula la migración, diferenciación y regeneración de células musculares (Chen & Li, 2009). De igual manera, por medio del rompimiento de la MEC, se contribuye a la migración de células endoteliales a tejidos cercanos que es un prerrequisito para la formación de nuevos vasos sanguíneos y se promueve la liberación de factores angiogénicos que se encuentran embebidos en la MEC, como por ejemplo, el VEGF (Grounds, 2008; Sternlicht & Werb, 2001).

El mantenimiento de la estructura tisular normal requiere una membrana basal íntegra, ya que desempeña una función crítica para la regeneración organizada de los tejidos. Se ha observado que aunque las células lábiles y estables sean capaces de regenerarse, la lesión del tejido, da lugar a la restitución de una estructura normal sólo si la MEC no está dañada. Los trastornos en estas estructuras llevan al depósito de colágeno o a la formación de cicatriz (Abbas et al., 2008).

H. Metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) son una familia de enzimas dependientes de calcio y de cinc (Carmeli et al., 2004), que degradan selectivamente componentes individuales de la matriz extracelular, tanto en procesos patológicos como fisiológicos (Chen & Li, 2009). Las MMPs se producen como zimógenos, algunas de las cuales son activadas durante su secreción, mientras que la mayoría son activadas extracelularmente por proteasas (Grounds, 2008). Las MMPs son los moduladores claves de varios procesos biológicos, entre los cuales podemos mencionar la formación del músculo esquelético, angiogénesis, migración celular, inflamación y cicatrización de heridas (Grounds, 2008). Por otro lado, las MMPs también participan en procesos patológicos como por ejemplo, en las enfermedades renales, progresión de tumores, metástasis y apoptosis (Carmeli et al., 2004).

Se han identificado 28 miembros de la familia de las MMPs en humanos (tabla 3), de las cuales 6 pertenecen a las del tipo de membrana (MT). Cada MMP interactúa de manera específica con ciertos componentes de la MEC, como por ejemplo, las colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18) tienen la habilidad de interactuar con colágenos tipo I, II y III y las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) degradan colágenos tipo IV, VII y X en diversos tejidos (Chen & Li, 2009).

En el músculo esquelético desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad funcional de las miofibras del músculo esquelético por medio de la remodelación de la MEC, ya sea por rompimiento de la misma y la regulación de la migración, diferenciación y regeneración de las células musculares (Carmeli et al., 2004; Chen & Li, 2009). Diversos estudios han demostrado el importante papel que desempeñan las MMP-1, MMP-2, MT1-MMP y MMP-9 en la migración de diferenciación de células satélites, tanto en cultivos celulares como en modelos animales (Chen & Li, 2009). Se ha descrito que la expresión de la MMP-2 y la MMP-9 se relacionan con la activación de células satélites y con la regeneración o formación de nuevas miofibras (Kherif et al., 1999); mientras que la MMP-1 es capaz de estimular la migración y diferenciación de mioblastos. La expresión de cada una de las MMPs varía conforme el curso del daño muscular y la reparación (Chen & Li, 2009). Por el otro lado la MT1-MMP es un factor indispensable en la

diferenciación morfológica de las células miogénicas y degradación de la fibronectina, la cual es un inhibidor de la fusión de células miogénicas (Ohtake, Tojo, & Seiki, 2006).

Tabla 3. Clasificación de algunas metaloproteinasas de matriz de acuerdo a su sustrato.

Grupo	MMP	Sustratos conocidos
Colagenasas		
	MMP-1	Colágeno I, II, III, VII, X, gelatina, agregano, versicano, proteína de unión de proteoglicanos, caseína, ovostatina, nidogen, serpinas, tenascina, entactina, entre otros.
	MMP-8	Colágeno I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatina, agregano, laminina, nidogen, entre otros.
	MMP-13	Colágeno I, II, III, IV, V, IX, X, XI, gelatin, agregano, fibronectina, laminina, perlecana, tenascina, entre otros.
Gelatinasas		
	MMP-2	Colágeno I, IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatina, agregano, elastina, fibronectina, laminina, nidogen, proteína de unión de proteoglicanos, entre otros.
	MMP-9	Colágeno IV, V, VII, X, XIV, fibronectina, laminina nidogen, proteína de unión de proteoglicanos, versicano, entre otros.
MMPs transmembranales		
	MMP-14 (MT1-MMP)	Colágeno I, II, III, gelatina, agregano, proteoglicanos que contienen dermatán sulfato, fibrina, fibronectina, laminina, nidogen, perlecana, tenascina, entre otros.
	MMP-15	Colágeno I, II, III, gelatina, agregano, fibronectina, laminina, nidogen, perlecana, entre otros.
	MMP-16	Colágeno I, III, gelatina, agregano, caseína, fibronectina, laminina, perlecana, entre otros.
	MMP-24	Gelatina, condroitín sulfato, dermatán sulfato, fibronectina, entre otros.

Fuente: (González-Ávila, González, Delgado, & Gutiérrez-González, 2010)

La composición de la MEC es un factor importante para garantizar una miogénesis exitosa. Durante la regeneración del músculo esquelético se ha descrito que la MEC intersticial inicial debe

ser removida, y posteriormente sustituida por componentes de tipo membrana basal, como es el caso de la fibronectina, que decrece de forma gradual durante la etapa de diferenciación celular y alcanza niveles basales durante la etapa de formación de miotubos (fusión de células miogénicas), la cual es considerada, como se mencionó anteriormente, como un regulador negativo de la diferenciación miogénica (Ohtake et al., 2006).

Por otro lado, existen varias formas en las que las MMPs contribuyen y/o desempeñan un papel importante durante la angiogénesis: a) favorecen en la migración de células endoteliales a tejidos cercanos por medio del rompimiento de la MEC; b) promueven la angiogénesis por medio de la liberación de factores angiogénicos que se encuentran embebidos en la MEC, como por ejemplo el VEGF o; c) pueden inhibir la angiogénesis por medio de la generación de productos anti-angiogénicos. De igual manera, es importante restablecer el balance entre las MMPs y sus inhibidores durante la maduración de los nuevos vasos sanguíneos para favorecer el desarrollo de la membrana basal y la diferenciación de las células endoteliales (Sternlicht & Werb, 2001).

I. Angiogénesis/revascularización

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Nguyen, Arkell, & Jackson, 2001). La matriz extracelular del músculo esquelético contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos que contribuyen a un buen suministro de sangre, esencial para proveer del oxígeno y la energía requerida para la contracción muscular. La formación de nuevos vasos sanguíneos es necesaria para que la regeneración pueda ocurrir. La angiogénesis es ~~el~~ un factor limitante, ya que en ausencia de una buena revascularización la progresión de una buena formación del músculo esquelético se ve afectada (Grounds, 2008).

Un prerrequisito para la formación de nuevos vasos sanguíneos es el rompimiento de la membrana basal y la matriz extracelular intersticial, ya que este precede a la proliferación y migración de células endoteliales capilares en el tejido circundante y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por lo tanto, la degradación proteolítica de la matriz extracelular es un componente crítico para que se produzca la invasión de células endoteliales durante la angiogénesis y para ello,

un balance adecuado entre las MMPs y los inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) son importantes en la neovascularización (Grounds, 2008).

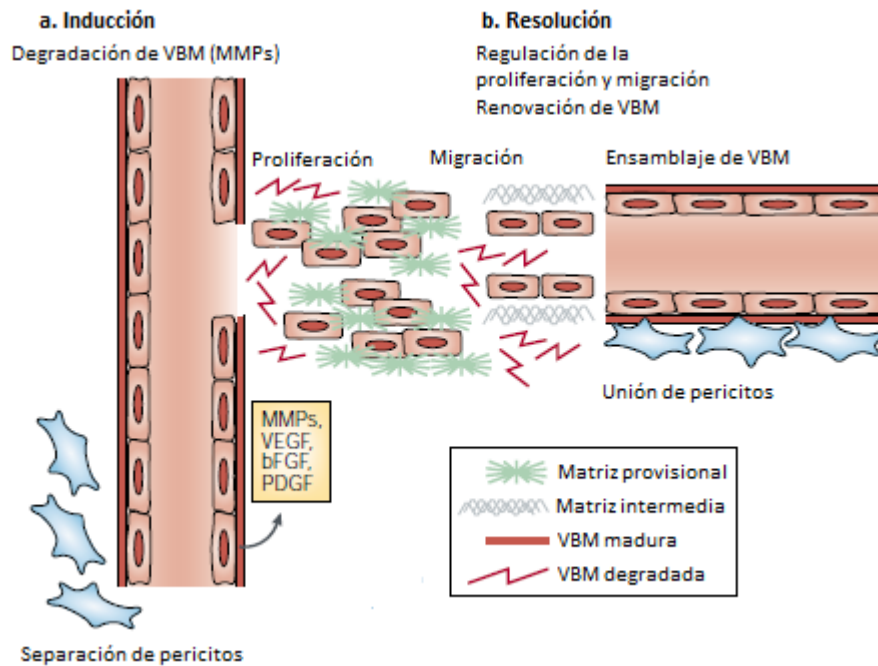
Las MMPs desempeñan un papel importante durante la angiogénesis. Montesano *et al* demostraron que la formación de tubos endoteliales en geles de colágeno es bloqueada por inhibidores de MMPs, como por ejemplo, 1,10-fenantrolina (Nguyen et al., 2001). Hallazgos más recientes indican que las MMPs, en particular las MMP-2 y MMP-9, desempeñan un papel central durante la angiogénesis. Ambas se caracterizan por su habilidad para degradar colágenos presentes en la membrana basal vascular. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado el rol de las gelatinasas durante la angiogénesis. Cuando células endoteliales son cultivadas en Matrigel, la formación de redes tubulares se incrementa con la adición de MMP-2 y decrece cuando es neutralizada con anticuerpos o se agrega TIMP-2. El papel de la MMP-9 se ha demostrado en ratones deficientes con MMP-9, los cuales exhiben un desarrollo anormal en la vascularización (Nguyen et al., 2001).

La angiogénesis ocurre a través de una serie sucesiva de pasos (Nguyen et al., 2001). Los dos pasos clave asociados al crecimiento capilar son: la proteólisis de las proteínas de la lámina basal y la proliferación celular (Carmeli et al., 2004). En el proceso de la angiogénesis, la lámina basal desempeña un papel fundamental, pues se ha observado que las células endoteliales vasculares se encuentran en un estado quiescente cuando están unidas a la lámina basal intacta. Cuando la lámina basal está siendo ensamblada o remodelada, se ha descrito que las células endoteliales pasan a un estado metabólicamente activo (Kalluri, 2003).

La angiogénesis es inducida como respuesta a diversos factores de crecimiento, siendo uno de los más importantes el VEGF (Kalluri, 2003; Mott & Werb, 2004). Inicialmente, la lámina basal vascular se degrada por diversas enzimas que degradan la matriz, como las MMPs. Esta degradación cumple con diversos propósitos, e incluye la liberación de las células endoteliales, para migrar y proliferar, la liberación de factores de crecimiento y la separación de los pericitos, los cuales envuelven y dan soporte a los vasos sanguíneos (Kalluri, 2003).

Una matriz provisional, la cual se encuentra en contacto directo con las células endoteliales liberadas, provee señales de proliferación a estas células. Luego, la secreción de factores de crecimiento (VEGF y otros) por la lámina basal, induce a la formación de una VBM intermedia y luego de una nueva (madura). Junto a las células endoteliales vasculares y los pericitos, la lámina basal vascular provoca la formación de un nuevo vaso sanguíneo (fig. 4) (Kalluri, 2003).

Figura 4. Fases de la angiogénesis



- a. En respuesta a factores de crecimiento y MMPs, la VBM sufre cambios estructurales y degradativos. La transición de una VBM a una matriz provisional promueve la proliferación y migración de células endoteliales vasculares. La membrana basal libera factores de crecimiento como la VEGF.
- b. Esto induce la formación de una VBM intermedia y luego una madura. La VBM, junto con las células endoteliales vasculares y pericitos, median la formación de un nuevo vaso sanguíneo. La VBM degradada durante este proceso tiene un rol crucial en la regulación de la angiogénesis.

Fuente: Adaptado de (Kalluri, 2003)

J. Modelos de buena y mala regeneración muscular con toxinas de *Bothrops asper*

Diversos estudios realizados tanto con veneno completo de *B. asper*, como con una metaloproteinasa hemorrágica (BaP1) y una fosfolipasa A₂ (PLA₂) miotóxica aisladas han permitido establecer que el proceso de regeneración muscular es más eficiente en los músculos tratados con la PLA₂ sola, comparado con el proceso de regeneración observado en músculos tratados con veneno completo o BaP1 (Gutiérrez, 2009; Hernández et al., 2011).

1. BaP1 y veneno completo (modelo de mala regeneración muscular)

Cuando un ratón es inyectado con veneno completo o con SVMPS hemorrágicas purificadas del veneno de *B. asper*, el proceso de regeneración muscular es pobre. En estas condiciones, las áreas necróticas del tejido permanecen por varios días después de la inyección del veneno, evidenciando un retraso en la remoción del desecho necrótico por fagocitosis. Las SVMPS hemorrágicas afectan drásticamente la microvasculatura, manifestándose una disminución en la densidad vascular. Por otra parte, el veneno de *B. asper* afecta las terminaciones nerviosas del músculo. Como consecuencia, las áreas dañadas del músculo son reemplazadas por tejido fibrótico. Estas áreas presentan un diámetro pequeño, y evidencian una regeneración incompleta y atrofia. Por otro lado, por medio de observaciones microscópicas se puede distinguir que las pequeñas fibras regenerativas presentan evidencias de degeneración, sugiriendo que estas células son detenidas en su diferenciación, probablemente como consecuencia de la falta de condiciones microambientales adecuadas necesarias para una regeneración apropiada (José María Gutiérrez, 2009).

Se ha propuesto que el daño a la microvasculatura debido a la hidrólisis enzimática de los componentes de la lámina basal provocado por las metaloproteinasas hemorrágicas del veneno de serpiente es un factor clave en una regeneración muscular deficiente (Escalante, Shannon, Mourada-Silva, Gutiérrez, & Fox, 2006; Hernández et al., 2011). Esta hipótesis se basa en la observación del mejoramiento en la regeneración por medio de la inhibición de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper*. Además, la inyección de una combinación de la miotoxina PLA₂ y SVMPS

hemorrágicas reproduce una pobre regeneración como la observada con la inyección del veneno completo (Gutiérrez, 2009). La BaP1 degrada las proteínas de la lámina basal, afectando así el endotelio capilar, induciendo varios cambios degenerativos que conllevan a la disrupción del capilar y hemorragias. Observaciones preliminares también demuestran degradación del endotelio en capilares del músculo esquelético (Rucavado et al., 1995).

2. Miotoxinas PLA₂ (Mtx) (modelo de buena regeneración muscular)

Cuando se inyecta un ratón con las miotoxinas PLA₂ aisladas del veneno de *B. asper*, la necrosis muscular aguda es seguida de una regeneración muscular exitosa (José María Gutiérrez, 2009). Los eventos degenerativos del músculo son seguidos por una reacción inflamatoria aguda asociada con dolor, edema y reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Luego comienza el proceso de regeneración, con activación de células satélite miogénicas y la fusión de mioblastos para formar miotubos, lo cual ocurre en el espacio delimitado por la lámina basal de la fibra muscular dañada, lo cual garantiza el mantenimiento de la arquitectura del tejido (Gutiérrez & Ownby, 2003a; Gutiérrez, 2009).

Después de la formación de miotubos, las células maduran para convertirse en una fibra muscular adulta totalmente regenerada, aunque ellas mantienen la posición del núcleo en una posición central por un lapso prolongado en modelos de ratón. La buena respuesta regenerativa observada después de la inyección de la miotoxina PLA₂ se explica sobre la base del cumplimiento de los factores requeridos para una regeneración muscular exitosa, un adecuado suministro de sangre, inervación, remoción del debris necrótico, y la permanencia de la lámina basal, ya que se observa que luego de la inyección de la miotoxina no se observa hemorragia, ni alteraciones histológicas en los vasos sanguíneos o nervios (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez, 2009).

IV. Justificación

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud pública relevante en la región latinoamericana (Gutiérrez, 2002). Se estima que, en países centroamericanos, *Bothrops asper* es la responsable de más del 50% del número total de casos, y además es responsable de la mayor parte de muertes debido a envenenamientos por mordedura de serpiente (Gutiérrez, 2009).

El veneno de *B. asper* se compone de una mezcla compleja de moléculas de diferente naturaleza bioquímica, predominando proteínas con diversa actividad enzimática, entre las cuales destacan las metaloproteinasas y las fosfolipasas A₂, ya que son las más abundantes y tienen una participación importante en el desarrollo de los eventos fisiopatológicos desencadenados por el veneno (Angulo & Lomonte, 2009).

En el envenenamiento por *B. asper* pueden presentarse desde casos leves hasta casos moderados o severos (Gutiérrez, 2009). El envenenamiento se caracteriza por una compleja serie de alteraciones patológicas en el sitio de inyección del veneno. Entre estas se puede mencionar edema, hemorragia, necrosis del músculo esquelético, dermonecrosis y formación de ampollas, entre otras (Jiménez, Escalante, Gutiérrez, & Rucavado, 2008). Estos efectos locales constituyen una causa frecuente de complicaciones en mordeduras de serpientes, lo cual puede conducir a pérdida de tejido o amputaciones (Lomonte et al., 2009).

El tratamiento para las mordeduras de serpiente se ha basado en la neutralización de las toxinas mediada por anticuerpos (Lomonte et al., 2009). Sin embargo, los efectos de la mordedura de serpiente se desarrollan rápidamente luego del envenenamiento, haciendo la neutralización por antisueros muy difícil, especialmente si el tratamiento es retrasado por un acceso tardío a cuidados médicos (León et al., 2000).

Dentro de los efectos ocasionados por la inyección del veneno de *B. asper*, el daño local al tejido es particularmente relevante, ya que esta es seguida de una regeneración muscular pobre, lo cual conlleva a una pérdida del tejido y pérdida de función del músculo esquelético (Hernández

et al., 2011). Para que el proceso de regeneración del músculo esquelético se lleve a cabo, es necesaria la eliminación del desecho celular, promovido por células del sistema inmune, seguido por el recambio de proteínas de la matriz extracelular, entre ellas fibronectina y colágeno tipo IV, y de la participación orquestada de factores de crecimiento y otras citoquinas que contribuyan a la activación, diferenciación y proliferación de nuevas células musculares (Grounds, 2008; Mott & Werb, 2004; Ohtake et al., 2006). Otro elemento importante durante el proceso de regeneración es la restitución adecuada de vasos sanguíneos, promovida por el recambio de elementos de la MEC, así como las conexiones nerviosas que hayan sido dañadas (Chargé & Rudnicki, 2004; Ehrhardt & Morgan, 2005; Tobin & Celeste, 2005).

Se han realizado estudios *in vivo* tanto con veneno completo de *B. asper*, como con una metaloproteinasa hemorrágica (BaP1) y miotoxinas PLA₂ (Mtx) aisladas, los cuales han permitido establecer que el proceso de regeneración muscular es más eficiente en los músculos tratados con la mezcla de miotoxinas (Mtx), en contraste con el proceso de regeneración observado en músculos tratados con veneno completo o BaP1 (Gutiérrez, 2009; Hernández et al., 2011).

Dado que se desconoce si el recambio inadecuado de proteínas de la MEC contribuye a la alteración del proceso de regeneración muscular observado después del envenenamiento causado por la mordedura de *B. asper*, en el presente trabajo se describe y compara el patrón de recambio de proteínas prototipo de matriz extracelular, como la fibronectina y colágeno tipo IV, en el proceso de regeneración muscular, utilizando veneno completo y BaP1 como modelos de mala regeneración muscular y Mtx como modelo de buena regeneración muscular.

La detección de alteraciones en el recambio normal de fibronectina y/o colágeno tipo IV en los modelos de mala regeneración muscular contribuirá al conocimiento general que se tiene sobre los mecanismos responsables de la alteración del proceso regenerativo después de la inyección del veneno de *B. asper*. Esta información, puesta a la disposición de la comunidad científica, permitirá el diseño y posterior ensayo de nuevos fármacos que mejoren el recambio de matriz extracelular después del accidente ofídico.

V. Objetivos

A. General

Describir el patrón de recambio de proteínas prototipo de matriz extracelular en los modelos de buena y mala regeneración muscular posterior a la inyección del veneno de *Bothrops asper* y sus toxinas aisladas.

B. Específicos

1. Describir el patrón de recambio de fibronectina y colágeno tipo IV en el proceso de regeneración muscular posterior a la inyección del veneno de *B. asper*.
2. Describir el patrón de recambio de fibronectina y colágeno tipo IV en el proceso de regeneración muscular posterior a la inyección de la metaloproteínasa hemorrágica BaP1 y la mezcla de miotoxinas PLA₂ (Mtx) de *B. asper*.
3. Comparar los patrones de recambio observados para determinar si existen diferencias cualitativas y temporales entre los modelos de buena y mala regeneración muscular.

VI. Materiales y Métodos

A. Universo de trabajo

Veneno completo de *Bothrops asper* y sus toxinas aisladas: metaloproteinasa hemorrágica (BaP1) y miotoxinas PLA₂ (Mtx).

B. Muestra

Homogenizados de músculos de 45 ratones cepa CD1, con peso entre 18-20 g, inyectados previamente con: i) veneno de *B. asper* 50 µg, ii) BaP1 50 µg, iii) miotoxinas PLA₂ (Mtx) 100 µg. Para cada tratamiento de los mencionados se utilizaron grupos de quince ratones, los cuales recibieron la inyección en el día 0. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron al día 1, a cada ratón se le extrajo el músculo gastrocnemio derecho, se prepararon los homogenizados de cada músculo en forma individual y posteriormente se hizo un pool con los tres homogenizados del mismo tratamiento. El mismo procedimiento se repitió los días 3, 5, 7, y 15.

C. Recursos

1. Recursos humanos

- Licda. Rosario Dámaris Hernández Hernández (asesora)
- Dra. Patricia Saravia Otten (asesora)
- Br. Erick Alexander Estrada Martínez
- Br. María Gabriela García Hernández
- Br. Lourdes María García Hernández

2. Recursos institucionales

- Laboratorio de Proteínas (LAP), Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

- Bioterio, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
- Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica

3. Recursos materiales

a. Equipo

- Agitador mecánico (Daigger)
- Microcentrífuga microCL 21T (Thermo)
- Micropipetas de volumen variable (Eppendorf)
- Homogenizador mecánico (Biospec)
- Sistema de electroforesis (Thermo)
- Sistema de transferencia OWL HEP-1 (Thermo)
- Cassette de autoradiografía Hypercassette (Amersham Biosciences)
- Fuente de poder Fotoforce250 (Fotodyne)

b. Materiales

- Jeringas de insulina descartables
- Pinzas
- Tijeras
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Puntas descartables de pipetas
- Tubos de vidrio
- Membrana PVDF (Millipore)
- Papel filtro Whatman No. 1

c. Reactivos

- Veneno completo de *B. asper* obtenido de un pool de al menos 40 serpientes adultas recolectadas en el pacífico de Costa Rica y mantenidas en el serpentario del Instituto de Clodomiro Picado
- BaP1
- Mezcla de miotoxinas PLA₂ (Mtx)

- Buffer de extracción
- Reactivos para cuantificación de proteínas, Protein Assay Kit, cat. No. 500-0112 (Bio-Rad).
- Solución de acrilamida: N, N'-metilen-bis-acrilamida (Bio-Rad)
- Isopropanol
- Buffer de corrida
- Buffer de carga reductor
- Buffer de transferencia
- Colorante Ponceau S 1x
- Agua desmineralizada ultra pura
- PBS/PBS-Tween
- Solución bloqueadora
- Anticuerpos primarios:
 - Anti-colágeno IV (anticuerpo de conejo anti-colágeno IV, ab6586, Abcam).
 - Anti-fibronectina (anticuerpo de conejo anti-fibronectina, ab23750, Abcam).
 - Anti-GAPDH (CB 1001 anti-GAPDH ratón mAB, 6C5, Calbiochem).
- Anticuerpos secundarios
 - Anti conejo (anticuerpo policlonal de burro secundario a conejo IgG – H&L (HRP) ab7083, Abcam).
 - Anti ratón (conjugado de peroxidasa de rábano y anticuerpo de cabra anti-ratón IgG (H+L), G-21040, Invitrogen).
- Lumi-light (Lumi-light^{plus} Sustrato para Western Blot, 12015196001, Roche)
- Solución de revelado (Ref. 1900943, Kodak GBX)
- Solución fijadora (Ref. 1901875, Kodak GBX)
- Marcador de peso molecular (HiMarkTM, Invitrogen)

D. Procedimiento

1. Tratamiento

Se evaluaron 3 tratamientos: (a) 50 µg de veneno completo de *B. asper*; o (b) 50 µg de BaP1; o (c) 100 µg de miotoxinas PLA₂ (Mtx), todos disueltos en PBS. Para cada tratamiento se estudiaron 5 tiempos diferentes (1, 3, 5, 7 y 15 días posteriores a la inoculación). Se sacrificaron por dislocación cervical 3 ratones por cada tiempo de estudio para cada tratamiento, haciendo un total de 45 ratones (anexo 2). Simultáneamente para cada tratamiento, se inyectó con PBS un grupo control de tres ratones bajo las mismas condiciones, los cuales se sacrificaron 24 horas posteriores a la inoculación. Todos los ratones del estudio tenían un peso entre 18 y 20 gramos y fueron inyectados en el músculo gastrocnemio derecho.

2. Procesamiento de muestras

a. Homogenización en frío y almacenamiento de músculo

- Colocar los músculos en microtubos, almacenar en hielo mientras se termina de remover los músculos de los ratones involucrados en el experimento.
- Almacenar los músculos a -70 °C hasta su procesamiento.
- Colocar los músculos de ratones en un tubo de vidrio estéril.
- Preparar el buffer de extracción con las tabletas del cocktail inhibidor de proteasas.
- Verter 1 ml de buffer de extracción y macerar el músculo utilizando el homogenizador mecánico; verificar que todo el músculo sea homogenizado por completo.
- Mantener en agitación constante a 4 °C por 1 hora.
- Centrifugar a 4 °C a 1200 rpm por 10 min.
- Separar el sobrenadante y colocarlo en tubos eppendorf.

- Almacenar a -70°C hasta su uso.

b. Cuantificación de proteínas (Bio-Rad, n.d.)

El kit de reactivos de cuantificación de proteínas Bio-Rad contiene un reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y un reactivo B (reactivo de Folin diluido)

- Preparar soluciones estándar de albúmina (de 0.0 a 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- Agregar 5 μL de los estándares y 5 μL de las muestras en tubos eppendorf por separado.
- Añadir 25 μL de reactivo A y 200 μL de reactivo B.
- Homogenizar y dejar reposar por 15 min.
- Leer en el espectrofotómetro a 630 nm.
- Realizar curva de calibración.
- Utilizando la ecuación de la curva de calibración, determinar la concentración de proteína en cada muestra.

3. Inmunodetección de proteínas por Western Blot (Lomonte, 2004).

- Ensamblar el sistema de electroforesis.
- Preparar el gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 15 %.
- Luego de verter el gel separador, esperar 20 min. a que polimerice. Agregar isopropanol sobre la mezcla.
- Retirar la sobrecapa de isopropanol.
- Colocar la solución del gel espaciador sobre el gel separador, y colocar el peine apropiadamente.
- Después de 20 minutos remover el peine. Colocar el gel en el equipo de electroforesis y llenar con el buffer de corrida.
- Limpiar los pozos con el mismo buffer de corrida, para eliminar burbujas de aire y remanentes del gel espaciador dentro de los pozos.
- Colocar las muestras preparadas anteriormente con buffer reductor.
- Cargar las muestras y el marcador de peso molecular en los pozos.
- Colocar el equipo de electroforesis en el tanque y llenar con buffer de corrida hasta cerrar el circuito.

- Tapar la cámara de electroforesis y correr a 150 voltios por una hora
- Preparar el sistema de transferencia. Para cada gel deben tenerse cortadas una membrana PVDF (Millipore) y 6 pedazos de papel filtro Whatman No. 1, de 10 cm x 7.5 cm.
- Poner a remojar la membrana PVDF (Millipore) en metanol por unos segundos, luego remojar en agua ultrapura por un minuto y por último buffer de transferencia por 15 minutos.
- Poner a remojar en buffer de transferencia los filtros por 15 minutos.
- Poner a remojar el gel en el que se llevó a cabo la electroforesis en buffer de transferencia por 15 minutos.
- Armar el sistema de transferencia, colocando en el cátodo tres pedazos de papel filtro humedecidos con el buffer de transferencia, luego el gel, seguido de la membrana, y por último los otros tres pedazos de papel filtro en el ánodo.
- Transferir-por 1 hora a 375 mAmp.
- Al finalizar, cortar la membrana del tamaño del gel y marcar las bandas del marcador. Identificar el extremo superior derecho de la membrana.
- Sacar la membrana, teñir con Ponceau S por 2 min. y lavar con agua desmineralizada ultra pura para determinar la eficiencia de la transferencia.
- Lavar con metanol brevemente, luego lavar con agua ultrapura por 2 minutos.
- Lavar la membrana 4 veces con PBS-Tween, 4 minutos cada lavada.
- Colocar en solución bloqueadora por 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente.
- Incubar la membrana con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación constante.
- Lavar la membrana 1 vez por 8 minutos y tres veces más por 4 minutos cada lavada con PBS-Tween.
- Agregar el anticuerpo secundario y agitar constantemente por una hora, a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana 1 vez por 8 minutos y tres veces más por 4 minutos cada lavada con PBS-Tween.
- Agregar 1 mL de Lumi-light e incubar por 5 minutos sin exposición directa a la luz.

- En el cuarto oscuro, colocar la membrana en el casete de autorradiografía y exponerlo a un film de rayos X por 2 minutos.
- Colocar el film expuesto en solución reveladora por 1 minuto.
- Lavar el film en agua destilada por 30 segundos.
- Colocar el film en solución fijadora por 5 minutos.
- Lavar con agua destilada por 30 segundos.
- Dejar secar

E. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño factorial 3x5, utilizando la variable “tratamiento” que puede relacionarse con la variable “tiempo” como un factor independiente, realizando tres réplicas por combinación (variable tratamiento-variable tiempo).

La variable “tratamiento” se refiere al uso de veneno completo y las toxinas BaP1 y Mtx para evaluar la respuesta regenerativa en el gastrocnemio derecho de los ratones utilizados.

La variable “tiempo” se refiere a los días posteriores a la inoculación del tratamiento en que fueron sacrificados los ratones para la obtención del músculo gastrocnemio derecho. Los tiempos evaluados fueron de 1, 3, 5, 7 y 15 días para cada tratamiento.

1. Análisis de resultados

El análisis de resultados es descriptivo con el fin de establecer el patrón de recambio de fibronectina y colágeno tipo IV en los músculos de ratones tratados con los 3 tratamientos anteriormente indicados, durante el período crítico de la regeneración muscular.

Para establecer el efecto de cada tratamiento sobre el recambio de proteínas de la matriz extracelular se comparó el patrón cualitativo de pérdida y recuperación de cada una de las proteínas, así como el establecimiento de diferencias temporales en la recuperación de las formas nativas de las mismas. Se tomó como patrón cualitativo de pérdida la disminución de la intensidad de las bandas y el aumento en el número de fragmentos de menor tamaño de las proteínas

estudiadas, mientras que el patrón cualitativo de recuperación como el aumento de la intensidad de las formas nativas y disminución en el número de las bandas que representaban fragmentos de degradación de las mismas.

Adicionalmente se realizó un análisis semi cuantitativo de las proteínas nativas mediante densitometría. Para ésta, se utilizó el programa ImageJ (1.48a) para medir la intensidad tanto de las proteínas fibronectina y colágeno IV tratados con veneno completo y Mtx como el GAPDH realizado para cada uno de los tratamientos. Este programa mide tanto la cantidad de pixeles en un área definida como la escala de grises presentada en esa área. Esta escala de grises asigna al área definida un valor entre 0 y 255, siendo 0 el valor asignado al negro y el 255 el valor asignado al blanco. Para cada resultado de fibronectina, colágeno y GAPDH se midieron las áreas de cada banda de proteínas y se les restó la media de 3 áreas sin exposición escogidas al azar, para poder obtener solamente el área negra.

El valor obtenido de las muestras se normalizó con los valores de la escala de grises obtenidos del GAPDH correspondiente a la muestra, ya que los datos de la expresión del GAPDH corrigen la variación de las muestras y compensan el error experimental. Con los valores de las muestras normalizados, se le asignó el valor arbitrario de 1 a los valores normalizados obtenidos para el control, ya que corresponde a la proteína de interés que no ha sido afectada por los tratamientos utilizados. Por lo tanto, los valores menores a 1 corresponden a una disminución de la cantidad de proteína nativa, mientras que los valores mayores a 1 corresponden a un aumento en la cantidad de proteína nativa.

VII. Resultados

El recambio de proteínas prototipo de MEC (fibronectina y colágeno IV) se evaluó en los modelos animales de buena y mala regeneración muscular descritos por Gutiérrez, Ownby & Odell (1984), Arce, Brenes, Gutiérrez, (1991) y Hernández, Cabalceta, Saravia-Otten, Chaves, Gutiérrez y Rucavado, (2011). Para ello, se inyectaron 3 ratones de la cepa CD1 en el gastrocnemio derecho por cada tiempo de estudio con uno de los siguientes tratamientos: i) 50 µg de veneno crudo de *B. asper*; ii) la metaloproteinasa aislada BaP1 (modelos de mala regeneración muscular); y iii) 100 µg de la fracción de miotoxinas PLA₂ (Mtx) del veneno (modelo de buena regeneración). Para cada tratamiento, se inyectó con PBS un grupo control de tres ratones bajo las mismas condiciones, los cuales se sacrificaron 24 horas posteriores a la inoculación.

Todos los ratones utilizados en el estudio fueron sacrificados por dislocación cervical en diferentes tiempos relevantes para el proceso de regeneración muscular (1, 3, 5, 7 y 15 días posteriores a la inyección). Los músculos inyectados fueron removidos, homogenizados y almacenados a -20° C hasta su análisis. Se evaluó el proceso de recambio del colágeno tipo IV y la fibronectina de la matriz extracelular en los dos modelos de regeneración muscular durante el tiempo del estudio por medio de la técnica de Western blot.

Simultáneamente se utilizó como control interno la detección y cuantificación de la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés) a todas las muestras procesadas. Por ser una enzima tisular intracelular expresada constitutivamente, GAPDH se utiliza en la técnica de Western blot como referencia, también llamada “control de carga”, para asegurar que se está colocando la misma cantidad de proteína total en cada pozo del gel de poliacrilamida, y que las diferencias que puedan detectarse en cuanto a la cantidad de colágeno IV y fibronectina en los homogenizados musculares se deben al efecto de los tratamientos.

Además, se realizó un análisis semi-cuantitativo de las proteínas en su forma nativa en los homogenizados musculares estudiados mediante la medición de la intensidad de las bandas inmunoreactivas en el Western blot, utilizando el programa ImageJ 1.48a (National Institute of Health-NIH).

La fracción de la metaloproteínasa hemorrágica (BaP1) enviada por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica no demostró la actividad proteolítica sobre el colágeno IV reportada anteriormente por Rucavado y colaboradores (1995), en donde la aplicación de dicho tratamiento en cantidades similares a las usadas en nuestro estudio provoca la desaparición casi total de proteína nativa a las 24 horas. Esta diferencia en actividad se reportó a los expertos del Instituto Clodomiro Picado, que respondieron indicando que algunos lotes de toxina pueden perder actividad durante el proceso de purificación. Debido a esto, no fue posible utilizar este tratamiento en el presente estudio, quedando únicamente la inyección con veneno completo como modelo de mala regeneración.

A. Colágeno tipo IV.

Como se muestra en la figura 1 (A y C), el anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo IV detectó específicamente una banda de ≈ 160 kDa en los homogenizados musculares de los ratones tratados con veneno, Mtx y los controles. Esta banda representa la forma nativa de la proteína, aunque debe mencionarse que en algunos experimentos se detectaron bandas de menor tamaño que representan formas de degradación de la proteína.

La cantidad de colágeno IV en músculos inyectados con Mtx disminuyó gradualmente durante los primeros 7 días después de la inyección hasta un 50% (fig. 1A y B), pero se recuperó alcanzando un valor cercano al observado en el control en el día 15. Debido a que el experimento solo contempló la detección de la proteína por 15 días después de la inyección de los tratamientos por ser el período de tiempo crítico para la regeneración muscular, no fue posible determinar cuándo alcanzó su nivel basal, pero se asume que el recambio de la proteína se completó.

Por otro lado, la cantidad de colágeno IV en los músculos inyectados con veneno se muestra muy disminuida en todos los tiempos del estudio con respecto al control inyectado con PBS (fig. 1C). La intensidad de las bandas de ≈ 160 kDa se analizó por densitometría, utilizando la intensidad de la banda de GAPDH para normalizar. El análisis (fig. 1D) reveló que la cantidad de colágeno IV en los días 1 y 3 del estudio disminuyó un 80% con respecto al control, el día 5 en aproximadamente 95%, y por último se observó una leve recuperación en los días 7 y 15 del experimento, sin observarse una recuperación mayor al 25%.

Este análisis demuestra un patrón de pérdida y recuperación de colágeno IV totalmente diferente en los modelos de mala y buena regeneración muscular, siendo la característica que más resalta la pérdida casi total de la proteína en los primeros 7 días después de la inyección de veneno, que representa la ventana de tiempo en donde ocurren los eventos claves para que ocurra una regeneración muscular exitosa (Grounds, 2008).

FIGURA 1

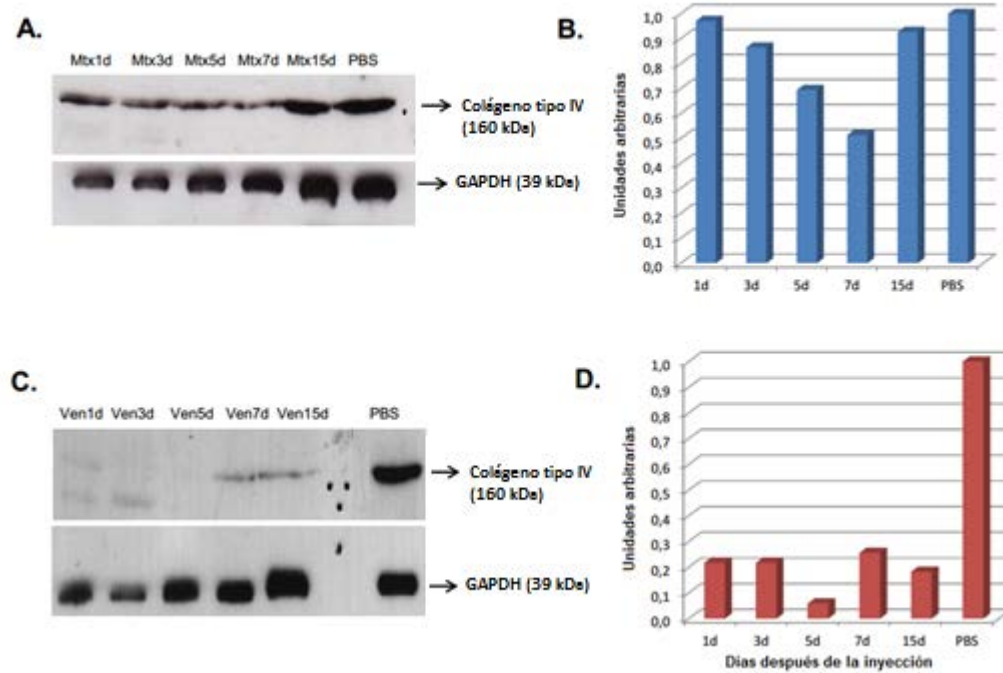


Fig. 1. Detección de colágeno tipo IV en homogenizados de músculo después de la inyección de veneno completo o miotoxinas PLA₂ (Mtx) de *B. asper*. Grupos de ratones fueron inyectados en el gastrocnemio derecho con (A) 100 µg de Mtx o (C) 50 µg de veneno completo de *B. asper*. Los músculos fueron removidos del ratón después de 1, 3, 5, 7 y 15 días (1d, 3d, 5d, 7d, y 15d, respectivamente). Los ratones control (PBS) fueron inyectados bajo las mismas condiciones con PBS y sacrificados 1 día después. La inmunodetección fue realizada con anticuerpos anti-colágeno IV y anti-GAPDH. La detección del GAPDH fue utilizado para la normalización en el análisis densitométrico en ambos tratamientos. (B) Análisis densitométrico del colágeno IV con Mtx. (D) Análisis densitométrico del colágeno IV con veneno completo.

B. Fibronectina.

El anticuerpo monoclonal anti-fibronectina detectó una banda de ≈ 250 kDa, que representa la forma nativa de la proteína, y varias bandas de menor tamaño (175–230 kDa) que se interpretaron como productos de degradación de la fibronectina por acción del veneno o la fracción Mtx (fig. 2A y C).

La intensidad de la banda de ≈ 250 kDa se analizó por densitometría, demostrando que la cantidad de proteína nativa en los músculos inyectados con Mtx aumentó moderadamente los primeros 3 días después de la inyección y que hubo un aumento dramático a partir del día 5, que se mantuvo hasta el día 15, alcanzando un valor de 400% comparado con el control (fig. 2A y B).

Los músculos inyectados con veneno mostraron un patrón de recambio totalmente diferente (fig. 2C y D), ya que se observó un aumento considerable (200-350%) en la cantidad de fibronectina detectada en los primeros 3 después de la inyección en comparación con el control. Sin embargo, se detectó en una cantidad comparable a la del control en el día 5, y mostró nuevamente un aumento moderado gradual de hasta el 60% en los siguientes días del estudio.

FIGURA 2

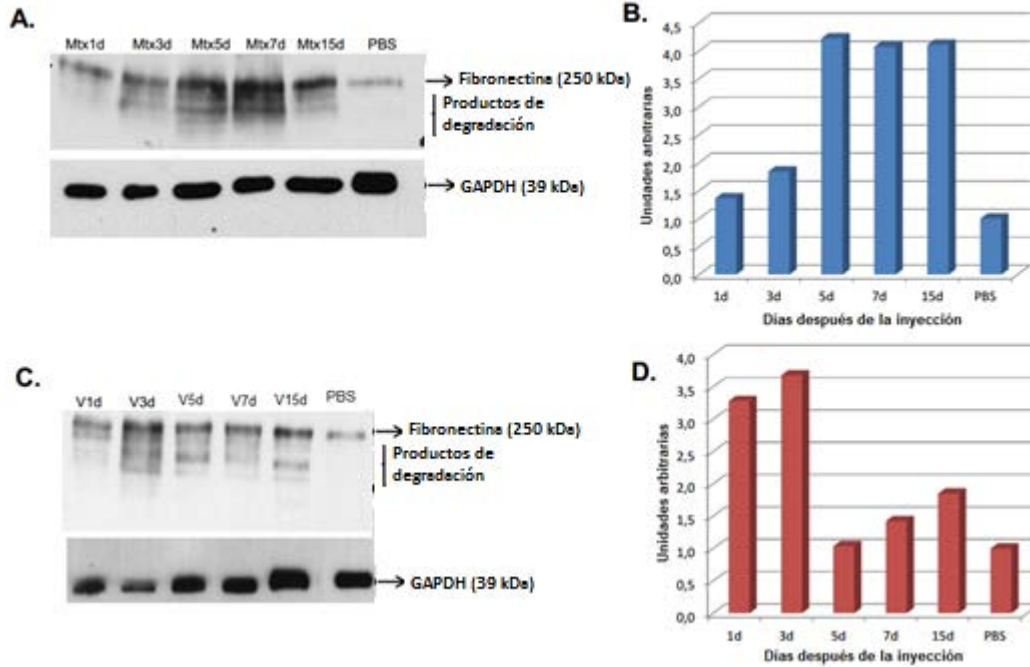


Fig. 2. Detección de fibronectina en homogenizados de músculo después de la inyección de veneno completo o miotoxinas PLA₂ (Mtx) de *B. asper*. Grupos de ratones fueron inyectados en el gastrocnemio derecho con (A) 100 µg de Mtx o (C) 50 µg de veneno completo de *B. asper*. Los músculos fueron removidos del ratón después de 1, 3, 5, 7 y 15 días (1d, 3d, 5d, 7d, y 15d, respectivamente). Los ratones control (PBS) fueron inyectados bajo las mismas condiciones con PBS y sacrificados 1 día después. La inmunodetección fue realizada con anticuerpos anti-fibronectina y anti-GAPDH. La detección del GAPDH fue utilizado para la normalización en el análisis densitométrico en ambos tratamientos. (B) Análisis densitométrico de la fibronectina con Mtx. (D) Análisis densitométrico de la fibronectina con veneno completo.

En la figura 2A se pueden observar los productos de degradación de la fibronectina después de la inyección de Mtx. En esta se observa un incremento gradual en la cantidad de fragmentos de fibronectina que alcanza su máximo valor 7 días después de la inyección del tratamiento y luego disminuye hacia el día 15. Aparentemente la cantidad de productos de degradación producidos es proporcional a la cantidad de proteína nativa.

En el caso del veneno, el patrón de degradación de la proteína es diferente, ya que a las 24 horas se observa la aparición de una banda de menor peso molecular, indicando el inicio de la proteólisis. A partir del día 3, se observa un aumento en la intensidad de estos fragmentos,

mientras que a los días 5 y 7 disminuye la intensidad de éstos. Al día 15 se observa únicamente la banda que representa la forma nativa de la fibronectina.

VIII. Discusión de resultados

La regeneración muscular es un proceso complejo que se caracteriza por la presencia de dos fases sucesivas: una degenerativa que precede a la regenerativa. Durante la fase degenerativa existe una inducción de inflamación, necrosis de las miofibras afectadas y fagocitosis del desecho celular, mientras que en la fase regenerativa se da una revascularización, proliferación y diferenciación de células satélite, elongación y fusión de mioblastos en miotubos y subsiguiente maduración, inervación y restauración de la función. Mientras que la fase degenerativa se da en los primeros días, la fase regenerativa comienza los días subsiguientes a la fase degenerativa y puede durar meses hasta la restauración completa de la función del músculo (Chargé & Rudnicki, 2004; Grounds, 2008).

Entre los factores que regulan este proceso regenerativo, cabe destacar los componentes de la matriz extracelular (MEC), los cuales poseen diferentes funciones durante dicho proceso. La lámina basal, compuesta principalmente de colágeno IV (Gulati, Reddi, & Zalewski, 1983), participa en la estimulación de la iniciación de la multiplicación celular, orientación apropiada de los mioblastos y delimita el espacio donde ocurre la replicación y fusión de éstos, proveyendo un andamio para la regeneración del nuevo tejido (Vracko & Benditt, 1972). Asimismo, se ha atribuido actividad angiogénica y antiangiogénica a fragmentos de colágeno IV (Sottile & Hocking, 2002). A la fibronectina, otro componente de la MEC, se le han atribuido diferentes funciones durante la regeneración muscular, tales como promover la migración y alineación celular, ensamblaje de matriz, regulación y estabilidad de la matriz extracelular y la proliferación de mioblastos, además de proveer una matriz provisional durante la regeneración (Podleski, Greenberg, Schlessinger, & Yamada, 1979; Sottile & Hocking, 2002; Vaz, Martins, Thorsteinsdóttir, & Rodrigues, 2012; White et al., 2008; Wight & Potter-Perigo, 2011). Adicionalmente, se pueden encontrar diversas moléculas que se están embebidas en la MEC, las cuales son secretadas en el proceso de regeneración de un tejido. Ejemplo de éstas son el VEGF y diversos factores de crecimiento, entre otros (Chen & Li, 2009; Mott & Werb, 2004).

La remodelación de la MEC durante la regeneración muscular en presencia de una lámina basal intacta se convierte entonces en un proceso importante para la promoción de la migración celular, la cual es un evento crítico en la formación de nuevos vasos sanguíneos. La participación de proteasas en la remodelación de la MEC conduce al recambio de las proteínas que la componen, asegurando la activación de factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión (Angosto & Álvarez-Gómez, 2010; Sottile & Hocking, 2002). Entre estas proteasas destacan las metaloproteinasas de matriz (MMPs), cuya expresión varía conforme al curso del daño muscular y la reparación (Chen & Li, 2009). Entre estas metaloproteinasas destacan las MMP-2 y MMP-9, llamadas colectivamente gelatinasas, y la MT1-MMP, la cual es un activador fisiológico de las MMP-2 y MMP-9 (Ohtake, Tojo, & Seiki, 2006). Estas MMPs comparten ciertos sustratos que se encuentran en la MEC tales como colágeno, fibronectina, tenascina, laminina, entactina, entre otros (Sternlicht & Werb, 2001).

Se han estudiado diferentes modelos de regeneración muscular, en donde el tipo de daño causado al tejido influye en el patrón de recambio de los componentes de la MEC. En estudios donde la lesión al músculo se realiza por contusión o por un autoinjerto, se observa una regeneración completa del tejido dañado. En dichos modelos la expresión de fibronectina es constante durante todo el proceso, mientras que la del colágeno IV parece tener un recambio al día 5 y alcanza una recuperación casi completa al día 15 de estudio. Cabe mencionar que en estos modelos, a diferencia de nuestro modelo de mala regeneración, no existe disrupción de la microvasculatura y la lámina basal se mantiene intacta (Grounds, Mcgeachie, Davies, Sorokin, & Maley, 1998; Letho, Duance, & Restall, 1985).

En modelos animales en donde se induce isquemia se ha determinado la importancia que juegan las MMP-2 y MMP-9 en la regulación del recambio de colágeno IV y lámina basal venular para promover la migración de leucocitos al sitio de lesión, incrementando el tamaño de los sitios de baja expresión de lámina basal preexistentes para facilitar la extravasación de neutrófilos y otras células (Reichel et al., 2008; Wang et al., 2006).

También se ha determinado el rol que juegan las metaloproteinasas y componentes de la MEC en cultivos celulares, que sugieren su importancia sobre la regulación de la matriz extracelular *in*

vivo. Ejemplo de esto es el rol que juega la fibronectina en momentos específicos durante el proceso de fusión de mioblastos en cultivo, se ha observado que promueve la migración de mioblastos, favoreciendo la posterior alineación celular y fusión (Vaz et al., 2012). Sin embargo, se ha descrito también que la presencia de un exceso de fibronectina exógena durante la elongación de mioblastos en cultivo inhibe la fusión, por lo que se ha sugerido que la regulación de la cantidad de fibronectina por la MT1-MMP en esa etapa es esencial para asegurar la correcta formación de nuevo tejido *in vivo* (Ohtake et al., 2006; Podleski et al., 1979; Shi & Sottile, 2011).

Aún cuando existen estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre el efecto del veneno completo y las metaloproteinasas que la componen sobre el colágeno IV hasta 24 horas de exposición (Escalante, Shannon, Moura-da-Silva, Gutiérrez, & Fox, 2006; Rucavado, Lomonte, Ovadia, & Gutiérrez, 1995), no se han realizado estudios que determinen el patrón de recambio de esta proteína *in vivo*, tanto en modelos de mala regeneración como en modelos de buena regeneración muscular. Es por esto que los hallazgos de nuestro estudio son novedosos ya que demuestran el comportamiento del colágeno IV en ambos modelos.

Diversos estudios han utilizado la inyección del veneno de *B. asper* y sus toxinas aisladas en gastrocnemio de ratón como modelos de mala y buena regeneración muscular, ya que se ha determinado que mientras la fracción Mtx produce necrosis sin afectar la microvasculatura y la MEC (Gutiérrez & Ownby, 2003), la BaP1 es capaz de degradar tanto fibronectina como colágeno (Rucavado et al., 1995), y el veneno completo induce daño a la lámina basal venular, produciendo hemorragia (Arce, Brenes, & Gutiérrez, 1991). En el modelo de buena regeneración muscular (Mtx) se observa una regeneración completa y oportuna, en donde la correcta aparición del infiltrado inflamatorio y remoción del desecho celular conlleva a la regeneración exitosa del tejido muscular (Hernández et al., 2011). Por otro lado, en modelos de mala regeneración muscular (veneno y BaP1) se observa un daño drástico a la microvasculatura, causando hemorragia que conlleva a una condición isquémica, la cual limita la llegada del infiltrado inflamatorio y macrófagos, limitando así la revascularización y correcta regeneración de las fibras musculares (Arce et al., 1991; Hernández et al., 2011).

En el presente trabajo se utilizó veneno de *B. asper* y Mtx, como modelos de mala y buena regeneración respectivamente, para estudiar los patrones de recambio del colágeno IV y la fibronectina en músculo de ratón. Los resultados obtenidos en el modelo de buena regeneración muscular con respecto al recambio de colágeno IV fueron los esperados, ya que se observa que existe una disminución progresiva de la proteína a partir de la inyección de Mtx, llegando a su nivel más bajo al día 7 y elevándose gradualmente hasta alcanzar niveles basales el día 15, comparables a los observados en el control (fig. 1A y 1B). Esto concuerda con otros estudios, en donde se ha demostrado que debe haber una lámina basal intacta para que exista el correcto recambio de las proteínas de la MEC (Arce et al., 1991; Gutiérrez & Ownby, 2003).

El comportamiento de la degradación del colágeno IV en el modelo de buena regeneración puede explicarse observando el patrón de comportamiento de la activación de las metaloproteinasas MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP (Robledo, 2012; Saravia-Otten, 2004; Saravia-Otten et al., 2013). En estos estudios se reportó que la MMP-9 y la MT1-MMP se encuentra elevadas en el día 1, lo cual podría promover la iniciación del recambio del colágeno IV, mientras que la MMP-2 está activa del día 1 al 15, alcanzando su pico en el día 7 (Saravia-Otten, datos no publicados), lo cual concuerda con el patrón de disminución y recuperación del colágeno IV observado en este trabajo.

El modelo de mala regeneración muscular presenta diferencias con respecto a la expresión y recambio del colágeno IV. Esta proteína se observa marcadamente disminuida durante todos los tiempos de estudio en comparación con el control y no recupera sus niveles basales aún 15 días después de la inyección del veneno (fig. 1C y 1D).

Se detectó la mínima cantidad de colágeno IV a los 5 días después de la inyección del tratamiento, lo cual puede atribuirse a la acción proteolítica continuada del veneno en el sitio de la inyección, ya que se ha demostrado que a los 5 días todavía existen trazas en el músculo tratado (Saravia-Otten et al., 2013). Además, ya que la MMP-2 alcanza su actividad máxima en el día 5 en músculos inyectados con veneno (Saravia-Otten, datos no publicados), esta metaloproteinasa podría contribuir al descenso drástico de la cantidad de colágeno IV. Sin embargo, esto no explica la razón por la cual no hay síntesis de colágeno IV en los siguientes días. Este fenómeno podría

deberse a que el veneno arrasa con la lámina basal y la MEC por lo que los mioblastos, encargados de producir colágeno IV (Rao, Beach, & Festoff, 1985), no podrían estar anclándose a una lámina basal preexistente, afectando el completo recambio de dicha proteína (Grounds et al., 1998; Vracko & Benditt, 1972).

El patrón de recambio de la fibronectina en los músculos inyectados con Mtx (modelo de buena regeneración) es un hallazgo inesperado, ya que la cantidad de proteína aumenta levemente en los primeros 3 días, pero se eleva considerablemente en los siguientes días y hasta el día 15 no se observa una disminución que se compare con el nivel basal de fibronectina detectado en los controles (fig. 2B).

Debido a que la inyección con la fracción Mtx no produce hemorragia ni degradación de la lámina basal capilar, aunque sí una respuesta inflamatoria importante, podría pensarse que el leve aumento de fibronectina en los primeros tres días se puede deber a una extravasación de fibronectina plasmática durante la respuesta inflamatoria inicial (Grinnell, Billingham, & Burguess, 1981). Durante los subsiguientes días existe una marcada elevación de fibronectina en su forma nativa (fig. 2B). Este hallazgo podría interpretarse como un aumento en la producción de fibronectina durante esta ventana de tiempo. Sin embargo, debido a que el anticuerpo anti fibronectina usado para este estudio no diferencia las isoformas plasmáticas y de matriz, no se puede determinar el origen específico de la fibronectina detectada en el homogenizado muscular, por lo que para poder explicar este fenómeno se requerirán más estudios, entre ellos la cuantificación de la expresión del gen que codifica por fibronectina *in situ*.

Otro resultado interesante es que se observa mayor cantidad de fragmentos de degradación mientras mayor es la cantidad de proteína nativa (fig. 2A). Este patrón de degradación sugiere que existe un mecanismo de regulación postraducciona, posiblemente mediante la expresión de MMP-MT1 (Ohtake et al., 2006; Shi & Sottile, 2011), para disminuir la cantidad de fibronectina. La expresión de la MMP-MT1 y otras metaloproteinasas endógenas explicaría parcialmente el patrón de degradación de fibronectina que se está observando, el cual inicia desde el día 1 y se acentúa hacia el día 7, que corresponde a los períodos de activación de MT1-MMP, MMP-9 y MMP-2 (Ohtake et al., 2006; Saravia-Otten et al., 2013; Shi & Sottile, 2011).

Por otra parte en el modelo de mala regeneración muscular se observa un incremento muy marcado de la cantidad de fibronectina durante los primeros tres días después de la inyección de veneno en comparación con los controles y con los músculos inyectados con Mtx. Dado que el veneno crudo contiene diversas metaloproteinasas y hemorraginas que producen hemorragia y degradación de la lámina basal capilar, es posible que la cantidad de fibronectina plasmática que llega al sitio de la lesión sea mayor a la que se produce cuando se inyecta Mtx, debido a la formación de la red de fibrina-fibronectina que se produce luego de una hemorragia (Wight & Potter-Perigo, 2011) y por ello se detectaron cantidades tan elevadas. Estas observaciones refuerzan la necesidad de realizar estudios moleculares que permitan explicar este fenómeno.

El patrón de degradación de la proteína (fig. 2C) en el modelo de mala regeneración podría atribuirse principalmente a la actividad de los componentes del veneno capaces de degradar fibronectina y de las células inflamatorias, ya que la temporalidad de aparición de estos fragmentos difiere del patrón de activación de MMPs endógenas en músculos tratados con veneno completo de *B. asper* (Saravia-Otten et al., 2013).

La elevada concentración de fibronectina detectada durante el período crítico para la regeneración muscular (3 días después de la inyección de veneno), seguida de una drástica disminución hacia el día 5, muestran un patrón de recambio de la proteína marcadamente diferente al observado en el modelo de buena regeneración. Es posible que la cantidad de proteína sea tan alta que produzca no solo la inhibición de la fusión de mioblastos, sino la desregulación de la expresión genética de *Fn* y de los mecanismos postraduccionales, que aseguran concentraciones adecuadas en la matriz extracelular (Ohtake et al., 2006).

En conclusión, las diferencias detectadas entre los patrones de recambio de fibronectina y colágeno IV en los modelos estudiados pueden explicar las diferencias en cuanto al resultado del proceso regenerativo. El recambio del colágeno IV en el modelo de buena regeneración implica que existe una lámina basal y una vasculatura presente, por ende, una regeneración del músculo y una correcta reinervación. El veneno, en cambio, al barrer con el colágeno IV, previene su

recambio por mecanismos aún no descritos. Éstos, sin embargo, deben estudiarse mejor para comprender la deficiente regeneración que produce el veneno en los tejidos dañados.

En el modelo de buena regeneración, la fibronectina detectada aumentó levemente los primeros días, lo cual podría estar enmascarando el recambio que sucede en la MEC. Esta cantidad cercana a la basal puede estar favoreciendo la regeneración en lugar de impedirla. Sin embargo, en el modelo de mala regeneración, se presenta una cantidad más elevada de fibronectina en los primeros tres días, lo cual pudo haber inhibido el proceso regenerativo, y el patrón de recuperación de fibronectina a partir del día 5 es muy leve en comparación con el modelo de buena regeneración. Los hallazgos encontrados, posiblemente modelo-dependiente, apoyan la noción que la presencia de fibronectina en cantidades controladas promueve la regeneración (Podleski et al., 1979; Sottile & Hocking, 2002; Vaz et al., 2012; White et al., 2008; Wight & Potter-Perigo, 2011), ya que se presenta de esta manera en el modelo inyectado con Mtx, que ha demostrado producir una buena regeneración muscular (Arce et al., 1991; Gutiérrez et al., 1984; Hernández et al., 2011). El patrón de recambio de fibronectina observado tras la inyección de veneno apoya esta noción, ya que los resultados sugieren que la cantidad y la temporalidad de la expresión de la proteína en el músculo deben estar bajo una regulación estricta, en sincronía con la liberación de factores de crecimiento y el estado de maduración (diferenciación) de los mioblastos para asegurar una correcta regeneración del tejido.

IX. Conclusiones

1. En el modelo de mala regeneración muscular se observó un patrón caracterizado por el aumento drástico en la cantidad de fibronectina los primeros tres días de estudio, seguido de una disminución en el séptimo día y un aumento gradual que superó los niveles basales de la proteína el día 15, mientras que el colágeno IV desapareció casi completamente durante todo el tiempo de estudio, sin evidencia de recuperación de la proteína.
2. En el modelo de buena regeneración muscular se observó un patrón caracterizado por un leve aumento de fibronectina en los primeros tres días de estudio, seguido de un aumento marcado de la proteína (400% en comparación con el nivel basal), el cual se mantuvo hasta el día 15, mientras que el colágeno IV disminuyó gradualmente los primeros siete días de estudio y luego aumentó gradualmente hasta casi alcanzar los niveles basales el día 15.
3. No se pudo determinar el patrón de recambio de fibronectina y colágeno IV utilizando la inyección de la metaloproteinasaBaP1 del veneno, debido a la pérdida de actividad proteolítica de la proteína durante el proceso de aislamiento en el Instituto Clodomiro Picado.
4. Los patrones de recambio de ambas proteínas, fibronectina y colágeno IV, son completamente diferentes en los modelos de regeneración estudiados, ya que presentan diferencias cualitativas, cuantitativas y temporales de expresión.

X. Recomendaciones

1. Es necesario estudiar el mecanismo fisiopatológico del veneno para determinar porque no existe una recuperación del colágeno IV.
2. Estudiar el gen de expresión de fibronectina y las isosformas que este produce para poder determinar el origen de la fibronectina detectada en estos procesos regenerativos.
3. Realizar estudios que permitan explicar el marcado aumento de fibronectina que se observa en el modelo de buena regeneración muscular y determinar si tiene alguna relevancia durante el proceso regenerativo.
4. Estudiar otras proteínas como laminina, entactina, tenascina, entre otras y las señales que estas puedan producir para poder observar un panorama más completo del proceso regenerativo en estos modelos.

XI. Referencias Bibliográficas

- Abbas, A. K., Robbins, S. L., Fausto, N., & Mitchell, R. N. (2008). *Patología Humana*. (V. Kumar, Ed.) (8th ed., p. 916). España: Elsevier Saunders.
- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 938–48. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.011
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. (M. Anderson & S. Granum, Eds.) (5th ed., p. 1601). New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Angosto, M. C., & Álvarez-Gómez, J. Á. (2010). Metaloproteinasas, matrix extracelular y cáncer. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 76(1), 59–84.
- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and Toxicology of Toxins Purified from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54, 949–57.
- Arce, V., Brenes, F., & Gutiérrez, J. M. (1991). Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *International Journal of Experimental Pathology*, 72(2), 211–26. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2002311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., & Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula* (6th ed., p. 934). México: Pearson Educación.
- Bio-Rad. (n.d.). DC Protein Assay Instruction Manual. Retrieved November 27, 2013, from http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/BIORAD_DC_Instr_Protein_Assay.pdf

- Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A. Z., & Coleman, R. (2004). Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle & Nerve*, *29*(2), 191–7. doi:10.1002/mus.10529
- Carmignac, V., & Durbeej, M. (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *The Journal of Pathology*, *226*(2), 200–18. doi:10.1002/path.3020
- Chargé, S. B. P., & Rudnicki, M. a. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, *84*(1), 209–38. doi:10.1152/physrev.00019.2003
- Chen, X., & Li, Y. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle. *Cell Adhesion & Migration*, *3*(4), 337–341.
- Ciciliot, S., & Schiaffino, S. (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Current Pharmaceutical Design*, *16*(8), 906–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041823>
- Ehrhardt, J., & Morgan, J. (2005). Regenerative Capacity of Skeletal Muscle. *Current Opinion in Neurology*, *18*(5), 548–553.
- Escalante, T., Shannon, J., Moura-da-Silva, A. M., Gutiérrez, J. M., & Fox, J. W. (2006). Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *455*(2), 144–53. doi:10.1016/j.abb.2006.09.018
- González-Ávila, G., González, A., Delgado, J., & Gutiérrez-González, L. H. (2010). Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, *22*(4), 328–336.
- Grinnell, F., Billingham, R. E., & Burgess, L. (1981). Distribution of Fibronectin During Wound Healing in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*, *76*, 181–189.
- Grounds, M. D. (2008). Extracellular Matrix and Skeletal Muscle Regeneration. In S. Schiaffino & T. Partridge (Eds.), *Skeletal Muscle Repair and Regeneration* (pp. 269–301). The Netherlands: Springer.

- Grounds, M. D., McGeachie, J. K., Davies, M. J., Sorokin, L. M., & Maley, M. A. L. (1998). The Expression of Extracellular Matrix During Adult Skeletal Muscle Regeneration : How the Basement Membrane , Interstitium and Myogenic Cells Collaborate. *Basic and Applied Myology*, 8(2), 129–141.
- Gulati, a K., Reddi, a H., & Zalewski, a a. (1983). Changes in the basement membrane zone components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration. *The Journal of Cell Biology*, 97(4), 957–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gutiérrez, J. M. (1995). Clinical Toxicology of Snakbite in Central America. In J. Meier & J. White (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (pp. 645–665). Miami: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes : 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, 50(2), 377–394.
- Gutiérrez, J. M. (2009). Bothrops asper: beauty and peril in the neotropics. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 901–3. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.012
- Gutiérrez, J. M. (2010). Snakebite Envenomation in Central America. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 491–507). United States: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 976–87. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.039
- Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (1995). Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops asper venoms. *Toxicon*, 33(11), 1405–1424.
- Gutiérrez, J. M., & Ownby, C. L. (2003a). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*

Official Journal of the International Society on Toxinology, 42(8), 915–931. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019491>

Gutiérrez, J. M., & Ownby, C. L. (2003b). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 42(8), 915–31. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.005

Gutiérrez, J. M., Ownby, C. L., & Odell, G. (1984). Skeletal Muscle Regeneration after Myonecrosis Induced by Crude Venom and a Myotoxin from the Snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). *Toxicon*, 22, 719–731.

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 958–75. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.038

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., & Escalante, T. (2010). Snake Venom Metalloproteinases. In S. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 115–138). United States: CRC Press.

Hayes, W. K., Herbert, S. S., Rehling, G. C., & Gennaro, J. F. (2002). Factors that Influence Venom Expenditure in Viperids and other Snake Species During Predatory and Defensive Contexts. In G. W. Schuett, M. Hoggren, M. E. Douglas, & H. W. Greene (Eds.), *Biology of the Vipers* (pp. 207–233). Utah: Eagle Mountain Publishing.

Hernández, R., Cabalceta, C., Saravia-Otten, P., Chaves, A., Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2011). Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: alterations in microvasculature and nerves. *PloS One*, 6(5), e19834. doi:10.1371/journal.pone.0019834

Jiménez, N., Escalante, T., Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2008). Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2421–8. doi:10.1038/jid.2008.118

- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 422–33. doi:10.1038/nrc1094
- Karp, G. (2009). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. (G. Karp, Ed.) (5th ed., p. 746). México: McGraw-Hill.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J. G., Verdière-Sahuqué, M., ... Alameddine, H. S. (1999). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Developmental Biology*, 205(1), 158–70. doi:10.1006/dbio.1998.9107
- Lehto, M., Duance, V. C., & Restall, D. (1985). Collagen and Fibronectin in a Healing Skeletal Muscle Injury. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 67(5), 820–828.
- León, G., Valverde, J. M., Rojas, G., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2000). Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 38(2), 233–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665804>
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology* (5th ed., p. 973). New York: W. H. Freeman.
- Lomonte, B. (2004). *Manual de Laboratorio. Inmunología General*. (B. Lomonte, Ed.). Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., & Núñez, V. (2009). Neutralization of *Bothrops asper* Venom by Antibodies, Natural Products and Synthetic Drugs: Contributions to Understanding Snakebite Envenomings and their Treatment. *Toxicon*, 54, 112–128.
- Meier, J., & Stoker, K. F. (1995). Biology and Distribution of Venomous Snakes of Medical Importance and the Composition of Snake Venoms. In J. Meier & J. White (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (pp. 367–410). Miami: CRC Press.

- Mott, J. D., & Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(5), 558–64. doi:10.1016/j.ceb.2004.07.010
- Nguyen, M., Arkell, J., & Jackson, C. J. (2001). Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(10), 960–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470230>
- Ohtake, Y., Tojo, H., & Seiki, M. (2006). Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 18), 3822–32. doi:10.1242/jcs.03158
- Podleski, T. R., Greenberg, I., Schlessinger, J., & Yamada, K. M. (1979). Fibronectin Delays the Fusion of L6 Myoblasts. *Experimental Cell Research*, 122, 317–26.
- Rao, J. S., Beach, R. L., & Festoff, B. W. (1985). Extracellular Matrix (ECM) Synthesis in Muscle Cell Cultures: Quantitative and Qualitative Studies During Myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 130(1), 440–46.
- Reichel, C. a, Rehberg, M., Bihari, P., Moser, C. M., Linder, S., Khandoga, A., & Krombach, F. (2008). Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(4), 864–74. doi:10.1189/jlb.1007666
- Robledo, B. (2012). *Expresión y Activación de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 en el Proceso Regenerativo del Músculo Esquelético después de la Necrosis Inducida por el Veneno y Toxinas de Bothrops asper (Garman)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., & Barbarisi, A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 199(2), 174–80. doi:10.1002/jcp.10471
- 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. *Experimental and Molecular Pathology*, 63, 186–99.

- Saravia-Otten, P. (2004). *Studies on Fibronectin Binding Proteins, Proteases, and Virulence in Staphylococcus aureus*. Karolinska Institute. Stockholm.
- Saravia-Otten, P., Gutiérrez, J. M., Arvidson, S., Thelestam, M., & Flock, J.-I. (2007). Increased infectivity of *Staphylococcus aureus* in an experimental model of snake venom-induced tissue damage. *The Journal of Infectious Diseases*, *196*(5), 748–54. doi:10.1086/520537
- Saravia-Otten, P., Robledo, B., Escalante, T., Bonilla, L., Rucavado, A., Lomonte, B., ... Gastaldello, S. (2013). Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. *Muscle & Nerve*, *47*(2), 202–12. doi:10.1002/mus.23489
- Sasa, M., Wasko, D. K., & Lamar, W. W. (2009). Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *54*(7), 904–22. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.024
- Shi, F., & Sottile, J. (2011). MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 23), 4039–50. doi:10.1242/jcs.087858
- Sottile, J., & Hocking, D. (2002). Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell Matrix Adhesions. *Molecular Biology of the Cell*, *3*(10), 3546–3559.
- Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *17*, 463–516. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.HOW
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., & Chaves, F. (2009). Inflammation Induced by *Bothrops asper* Venom. *Toxicon*, *54*, 988–97.
- Tobin, J., & Celeste, A. (2005). Myostatine, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, *5*, 328–332.

- Vaz, R., Martins, G. G., Thorsteinsdóttir, S., & Rodrigues, G. (2012). Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model. *Cell and Tissue Research*, 348(3), 569–78. doi:10.1007/s00441-012-1364-1
- Viladot, A. (2001). *Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor*. (A. Viladot, Ed.) (p. 342). Estados Unidos: Springer Science and Business Media.
- Vracko, R., & Benditt, E. P. (1972). Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. *The Journal of Cell Biology*, 55(2), 406–19. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2108791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wang, S., Voisin, M.-B., Larbi, K. Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., ... Nourshargh, S. (2006). Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), 1519–32. doi:10.1084/jem.20051210
- White, E. S., Baralle, F. E., & Muro, A. F. (2008). New insights into form and function of fibronectin splice variants. *The Journal of Pathology*, 216(1), 1–14. doi:10.1002/path.2388
- White, E. S., & Muro, A. F. (2011). Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life*, 63(7), 538–46. doi:10.1002/iub.493
- Wight, T. N., & Potter-Perigo, S. (2011). The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(6), G950–5. doi:10.1152/ajpgi.00132.2011

XII. Anexos

1.-Recetas de reactivos

a) Persulfato de amonio (APS) al 10%

Componente	5 alícuotas	10 alícuotas
Persulfato de amonio, BioRad	0.5 g	1 g
Agua ultrapura	5 ml	10 ml

- Disolver el persulfato en el agua ultrapura
- Almacenar en alícuotas en congelación.

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

b) Buffer de carga reductor

Componente	2x
Tris-HCl pH 6.8	10 ml
SDS 10% p/v	16 ml
Azul de bromofenol, Sigma	50 mg
Glicerol, Invitrogen	12 ml
Agua ultrapura	2 ml

- Mezclar los componentes en el agua ultrapura, almacenar en temperatura ambiente no más de 2 meses.
- Para realizar el buffer de carga reductor, se agregan 100 μ l de 2-mercaptoetanol (Bio-Rad) en 900 μ l de la mezcla original. Esta mezcla también se almacena a temperatura ambiente.

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

c) Buffer de extracción

Componente	50 ml	100 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.6	2.5 ml	5 ml
NaCl 0.5 M	15 ml	30 ml
EDTA 0.5 M pH 8	2 ml	4 ml
Triton x-100, Merck	0.5 ml	1 ml
SDS 10% p/v	0.5 ml	1 ml
Agua ultrapura	29.5 ml	59 ml

- Se agrega el agua ultrapura, luego se agregan los demás reactivos en orden descendente de volumen.
- Se mezcla bien, y se almacena en refrigeración.
- Las concentraciones finales resultantes son: Tris-HCl 0.025 M, NaCl 0.15 M, EDTA 0.02 M, Triton x-100 1% v/v y SDS 0.1% p/v.

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

d) Buffer de tanque

Componente	1x	5x
Tris (trizma base), Calbiochem	3 g	15 g
Glicina, Merck	14.4 g	72 g
SDS 10%	10 ml	50 ml
Agua ultrapura	1000 ml	1000 ml

- Disolver el tris y la glicina en 2/3 del agua ultrapura
- Agregar el SDS 10%
- Aforar hasta 1000 ml con agua ultrapura.
- Almacenar a temperatura ambiente.

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

e) Buffer de transferencia

Componente	1x
Tris (trizma base)	5.82 g
Glicina	2.93 g
Agua ultrapura	800 ml
Metanol, Merck	200 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolver tris y glicina en agua ultrapura. ▪ Agregar el metanol y mezclar bien. ▪ Almacenar en refrigeración. 	

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

f) EDTA 0.5 M pH 8

Componente	50 ml
EDTA, Merck	9.306 g
Agua ultrapura	50 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolver EDTA en ½ del agua ultrapura. ▪ Para disolver, agregar esferas de NaOH. ▪ Ajustar pH con HCl 6 N, agregar el resto de agua ultrapura. ▪ Almacenar en refrigeración. 	

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

g) NaCl 0.5 M

Componente	100 ml
NaCl, Merck	2.922 g
Agua ultrapura	100 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agregar el NaCl en agua ultrapura y mezclar hasta que esté disuelto. ▪ Autoclavear y almacenar en refrigeración. 	

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

h) PBS (PBS-Tween)

Componente	1x	10x
NaH ₂ PO ₄ , Merck	0.21 g	2.1 g
Na ₂ HPO ₄ , Merck	1.44 g	14.4 g
NaCl	8.7 g	87 g
Agua ultrapura	1000 ml	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolver componentes en agua ultrapura. Autoclavear ▪ Para preparar PBS-Tween, luego de autoclavar, agregar 1 ml de Tween 80 (Merck) por cada 100 ml de PBS preparado. ▪ Almacenar a temperatura ambiente. 		

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

i) Solución reveladora

Componente	475 ml
Revelador, Kodak	Volumen indicado
Agua destilada	400 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agregar el volumen indicado en la botella original del reactivo y aforar a 475 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente ▪ Duración de 1 mes o hasta que disminuya de los 400 ml. 	

Kodak GBX revelador y reforzador, ref. 1900943

j) Solución fijadora

Componente	475 ml
Fijador, Kodak	Volumen indicado
Agua destilada	40 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agregar el volumen indicado en la botella original del reactivo y aforar a 475 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente ▪ Duración de 1 mes o hasta que disminuya de los 400 ml. 	

Kodak GBX fijador y reforzador, ref. 1901875

k) SDS 10%

Componente	1x
SDS, USB	10 g
Agua ultrapura	70 ml
<ul style="list-style-type: none">▪ Disolver SDS en agua ultrapura▪ Aforar hasta 100 ml	

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

l) Solución de bloqueo 5% p/v

Componente	100 ml
Leche descremada en polvo, Dos Pinos	5 g
PBS-Tween	100 ml
<ul style="list-style-type: none">▪ Disolver leche descremada en PBS-Tween▪ Guardar en refrigeración.	

S.A. (2009) Lumi-Light Western Blotting Substrate. Cat. No. 12 015 200 001. Roche Applied Sciences. Disponible en https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/12015200001_en_07.pdf

m) Tris-HCl pH 6.8

Componente	100 ml
Tris (trizma base)	6.1 g
SDS 10%	4 ml
Agua ultrapura	96 ml
<ul style="list-style-type: none">▪ Disolver el tris y SDS 10% en 50 ml de agua ultrapura.▪ Ajustar pH a 6.8 con HCl▪ Aforar a 100 ml con agua ultrapura.▪ Guardar en refrigeración	

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

n) Tris-HCl pH 7.6

Componente	100 ml
Tris (trizma base)	6.057 g
Agua ultrapura	100 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolver el tris en 50 ml de agua ultrapura ▪ Ajustar el pH con HCl ▪ Aforar hasta 100 ml con agua ultrapura. ▪ Autoclavear ▪ Guardar en refrigeración 	

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

o) Tris-HCl pH 8.8

Componente	100 ml
Tris (trizma base)	18.2 g
SDS 10%	4 ml
Agua ultrapura	96 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolver el tris y SDS 10% en 50 ml de agua ultrapura. ▪ Ajustar el pH a 8.8 con HCl ▪ Aforar a 100 ml con agua ultrapura. ▪ Guardar en refrigeración 	

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

p) Gel compactador

Componente	2480 µl
Agua ultrapura	1543 µl
Buffer Tris-HCl pH 6.8	625 µl
Poliacrilamida	275 µl
APS	50 µl
TEMED	7 µl
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agregar cada componente en el orden listado arriba, agregando el TEMED hasta que se vaya a verter. 	

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

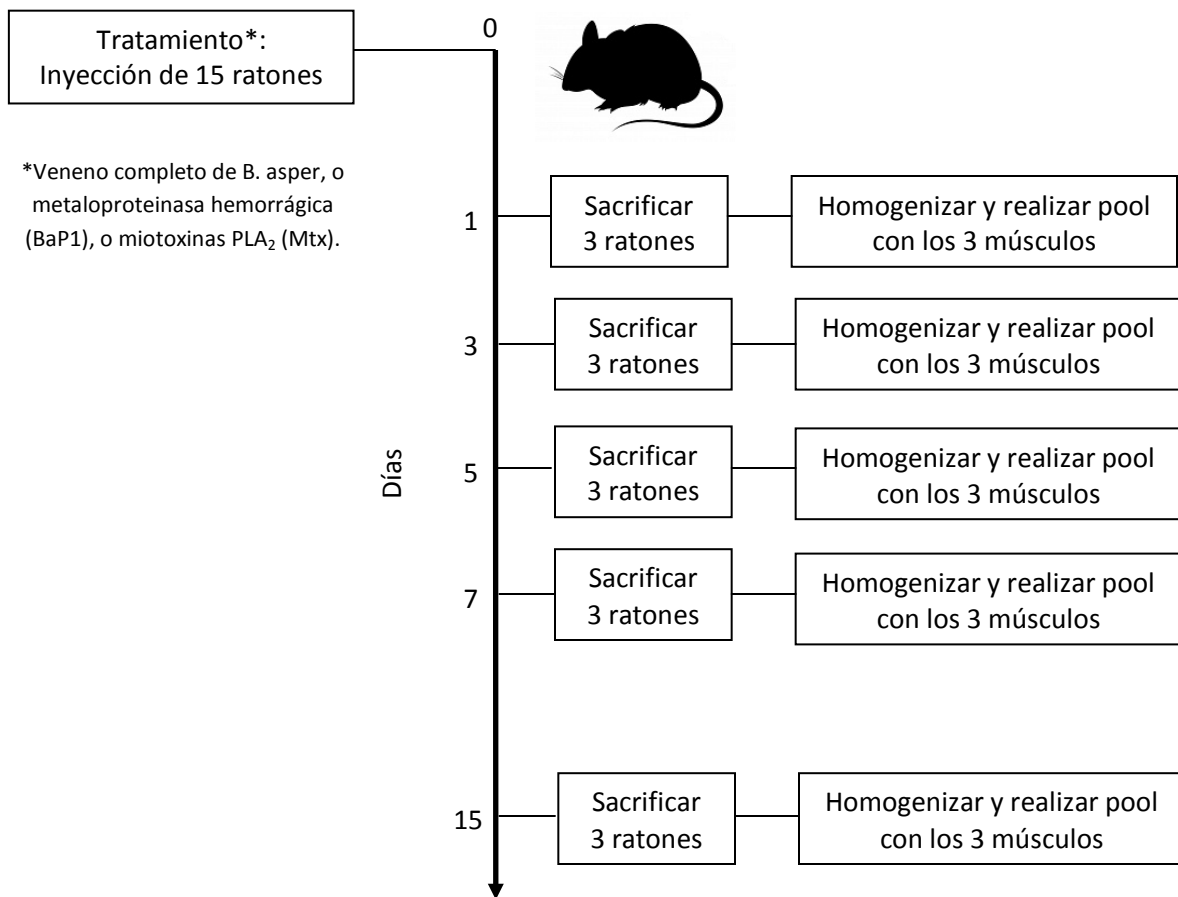
q) Gel separador

Gradiente	Componente				
	Agua ultrapura	Poliacrilamida	Buffer Tris-HCl pH 8.8	APS	TEMED
6%	577 μ l	162 μ l	250 μ l	10 μ l	1 μ l
9%	496 μ l	243 μ l	250 μ l	10 μ l	1 μ l
12%	415 μ l	324 μ l	250 μ l	10 μ l	1 μ l
15%	334 μ l	405 μ l	250 μ l	10 μ l	1 μ l

- Utilizar un tubo eppendorf para cada mezcla de gradiente
- Agregar cada componente en el orden listado del gel compactador.
- Agregar el TEMED hasta que se vaya a verter.

Lomonte, B. (2004) Manual de Laboratorio. Inmunología General. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.

2.-Procedimiento: tratamiento



Lourdes María García Hernández
Autora

Erick Alexander Estrada Martínez
Autor

María Gabriela García Hernández
Autora

Rosario Damaris Hernández Hernández, MSc.
Asesora

Patricia Saravia-Otten, PhD.
Asesora

Rubén Daríel Velásquez Miranda, PhD.
Revisor

María Eugenia Paredes Sánchez, MSc.
Directora de escuela

Rubén Daríel Velásquez Miranda, PhD.
Decano