

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

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).

**Informe de Tesis presentado por
Bárbara Regina Robledo Fong
Para optar al título de Bióloga**

Guatemala, marzo de 2012

JUNTA DIRECTIVA

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Oscar Cóbar Pinto, Ph.D. | Decano |
| Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A. | Secretario |
| Licda. Liliana Vides de Urizar | Vocal I |
| Dr. Serio Alejandro Melgar Valladares | Vocal II |
| Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli | Vocal III |
| Br. Fausto René Beber García | Vocal IV |
| Br. Carlos Francisco Porras López | Vocal V |

DEDICATORIA

A Dios por permitirme estar aquí y maravillarme con su creación cada día más.

A mis Padres por darme la vida y su amor, por ser mi primera y más importante fuente de enseñanza.

A Pablo por estar siempre a mi lado con amor, empujándome a alcanzar mis metas y ser cada día mejor persona y profesional.

A mis hermanos por ser una parte esencial en mi vida, por su amor y amistad.

A Mariele, Paty, Carlos, Allan y todos los que me dieron ánimos para llegar hasta aquí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Patricia Saravia la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo, su tiempo y asesoría. Al Depto. de Bioquímica y al LENAP por el espacio brindado para la realización de esta investigación. Al Instituto Clodomiro Picado por proporcionar el veneno y toxinas aisladas, y especialmente J.M. Gutiérrez y Rosario Hernández por los valiosos aportes y discusión durante el desarrollo de este trabajo. Este trabajo fue realizado con el financiamiento de NeTropica, proyecto 02N-2008.

Finalmente, un agradecimiento especial a Carlos y Allan por su apoyo en el laboratorio y por los buenos momentos compartidos que hicieron más fácil llevar a cabo la investigación.

ÍNDICE

| | página |
|--|---------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1. Envenenamiento por <i>Bothrops asper</i> (Garman, 1984) | 4 |
| 3.1.1. Descripción de <i>Bothrops asper</i> (Garman, 1984) | 4 |
| 3.1.2. Distribución de <i>Bothrops asper</i> (Garman, 1984) | 5 |
| 3.1.3. Composición del veneno | 6 |
| 3.1.3.1. Metaloproteinasas | 6 |
| 3.1.3.2. Fosfolipasas A ₂ | 8 |
| 3.1.4. Patología del envenenamiento | 9 |
| 3.2. Matriz Extracelular | 12 |
| 3.3. Metaloproteinasas de Matriz | 14 |
| 3.3.1. Rol de las MMP en el músculo esquelético durante la regeneración | 17 |
| 3.3.2. Expresión y activación de las MMP en envenenamiento por serpiente | 19 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 21 |
| 5. OBJETIVOS | 22 |
| 5.1. Objetivo general | 22 |
| 5.2. Objetivos específicos | 22 |
| 6. HIPÓTESIS | 23 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 7.1. Población y Muestra | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2. Materiales | 24 |
| 7.2.1. Venenos y Toxinas | 24 |
| 7.3. Métodos | 24 |
| 7.3.1. Tratamientos | 24 |
| 7.3.2. Estudio de la expresión y activación de MMP-2 y MMP-9 en homogenizados de músculo de ratón | 25 |
| 7.3.3. Análisis histológico de la regeneración del tejido muscular | 26 |
| 7.3.4. Diseño Experimental | 26 |
| 7.3.5. Análisis estadístico | 27 |
| 8. RESULTADOS | 28 |
| 8.1. Expresión y activación de MMP-2 y MMP-9 en homogenizados de músculos de ratón | 28 |
| 8.2. Daño y regeneración del tejido muscular en cortes histológicos | 30 |
| 9. DISCUSION | 37 |
| 10. CONCLUSIONES | 41 |
| 11. RECOMENDACIONES | 42 |
| 12. REFERENCIAS | 43 |
| 13. ANEXOS | |
| ANEXO 1 Fotografía de <i>Bothrops asper</i> (Garman, 1984) | 52 |
| ANEXO 2 Mapa de distribución de <i>Bothrops asper</i> (Garman, 1984) | 53 |
| ANEXO 3 Clasificación de las metaloproteinasas de matriz | 54 |

1. RESUMEN

La reparación del tejido muscular tras una lesión es un proceso finamente orquestado que incluye cambios en la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC). En este proceso las metaloproteínas de matriz juegan un papel importante. Estudios previos han demostrado que diferencias en los patrones de expresión a través del proceso regenerativo de las metaloproteínas de matriz MMP-2 y MMP-9, conocidas colectivamente como gelatinasas, derivan en resultados diferentes de reparación del tejido. El envenenamiento ofídico por *Bothrops asper* se caracteriza a nivel local por edema, dolor, hemorragia y necrosis muscular. Un cuadro frecuente en los casos de envenenamiento severo es una regeneración deficiente del músculo afectado, lo que ocasiona disfunción del músculo, pérdida de masa muscular y fibrosis, dando por resultado secuelas permanentes en el afectado.

En estudios *in vivo* realizados en ratones inyectados con veneno crudo o toxinas de *B. asper*, se ha reportado que hay una mejor recuperación del músculo tras la inyección de fosfolipasas A₂ y homólogos de las fosfolipasas A₂, en contraste con la recuperación parcial obtenida tras la inyección de veneno crudo o metaloproteinasas del veneno de serpiente. En el presente estudio se hipotetizó que la deficiencia observada en la habilidad del músculo de ratón para regenerarse después de la inyección de veneno crudo o de la metaloproteína BaP1, en comparación con la buena regeneración producida al inyectarse el músculo con la miotoxina Mtx-1, se debe a patrones de expresión y activación diferentes de la MMP-2 y/o MMP-9 a través del proceso regenerativo.

Se encontró que tras la lesión provocada por el veneno y sus toxinas, las formas inmaduras de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se expresaron en todos los tratamientos. Sin embargo, el patrón de expresión temporal y activación de estas proteínas varió de acuerdo al tratamiento administrado. En el modelo de buena regeneración (inyección de Mtx-1), los patrones fueron los esperados y que han sido descritos por otros autores. Sin embargo, en los modelos de mala regeneración (músculos inyectados con veneno y BaP1) se presentó una expresión tardía de la MMP-2 activada. Interesantemente, la activación de la MMP-9

solo se dio en los ratones tratados con Mtx-1. Así mismo, la regeneración del tejido en el estudio histológico mostró tendencias de recuperación distintas según el tratamiento, siendo mejor para Mtx-1 que para veneno o BaP1. Los hallazgos de este estudio sugieren que la activación a destiempo de la MMP-2 y la falla en la activación de la MMP-9 están afectando el recambio de la MEC, así como la revascularización correcta y en tiempo en los tratamientos modelo de mala regeneración. La incorrecta remoción de la MEC afectada podría estar evitando la fusión de mioblastos y la liberación de factores de crecimiento y señales moleculares importantes para la regeneración del tejido muscular y vascular. Así mismo, la inadecuada revascularización tras el envenenamiento se especula evitaría la llegada de oxígeno, nutrientes y un correcto balance entre activadores e inhibidores de las gelatinasas en el momento adecuado, lo que podría ser en parte la casusa de una regeneración muscular empobrecida.

2. INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud pública en el área centroamericana, que afecta principalmente a la población rural. En la mitad de los casos de accidente ofídico la serpiente responsable es la barba amarilla o terciopelo, *Bothrops asper* (Garman, 1884). Después del envenenamiento por esta serpiente hay una regeneración muscular deficiente cuyas causas aún no han sido establecidas.

Las metaloproteínasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas dependientes de zinc que han demostrado tener un papel importante en el mantenimiento de la matriz extracelular (MEC) y en la remodelación de tejidos. En cuanto al tejido muscular, las MMP tienen un papel regulador en el crecimiento y desarrollo, y también son importantes en el proceso de reparación después de una lesión traumática. Sin embargo, niveles altos o expresión a destiempo de las formas activadas de éstas puede llevar a estados patológicos de destrucción tisular.

En esta investigación se determinó el patrón de expresión y activación de las metaloproteinasas de matriz involucradas en regeneración muscular, MMP-2 y MMP-9, después de la inyección de veneno crudo en gastrocnemio de ratón. Adicionalmente, se evaluó el patrón de expresión y activación de las mismas metaloproteinasas de matriz al inyectar el veneno crudo y dos toxinas aisladas del veneno: la metaloproteína hemorrágica BaP1 y la fosfolipasa A₂ miotoxina I, con el fin de evaluar modelos animales de mala regeneración (inyección intramuscular de BaP1 y veneno crudo), y compararlo con un modelo animal de buena regeneración (inyección intramuscular de la miotoxina I). Los hallazgos de los patrones de expresión se compararon con el proceso de regeneración del músculo a través del análisis morfológico de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Todo esto se llevó a cabo durante el período de inflamación aguda y de regeneración muscular posterior a la necrosis inducida por el veneno o su toxinas aisladas, a intervalos de tiempo establecidos por hasta 15 días.

Con esta investigación se obtuvo mayor información sobre la patogénesis local causada por la mordedura de barba amarilla, que a su vez permitirá desarrollar, en un futuro, tratamientos efectivos que mejoren la regeneración muscular.

3. ANTECEDENTES

3.1. Envenenamiento por *Bothrops asper* (Garman, 1884)

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud pública en el área Centroamericana que afecta principalmente a la población rural. Casi en la mitad de los casos de accidente ofídico la serpiente involucrada es *B. asper*. La mayoría de de mordeduras de serpiente se da mientras se trabaja en el campo, de ahí que el grupo más afectado sean hombres de entre 5 y 25 años de edad. En cuanto a la localización de la mordedura, en aproximadamente el 50% de las veces es en el pie, 18% en la pantorrilla y 32% en las extremidades superiores, predominantemente la mano. El veneno causa serios daños locales al tejido y alteraciones sistémicas. (Gutiérrez, 1995)

3.1.1. Descripción de *Bothrops asper* (Garman, 1884)

El género *Bothrops* pertenece a la familia Viperidae, subfamilia crotalinae. A las serpientes de esta subfamilia también se les conoce en inglés como “pit vipers” por poseer fosetas loreales situadas entre el ojo y el orificio nasal, a ambos lados de la cabeza. Estas fosetas loreales son sistemas de sensores de calor que le permiten a la serpiente localizar presas por las diferencias de temperatura en el ambiente que la rodea. Además, poseen glándulas de veneno especializadas para la caza, defensa y promoción de la digestión (Meier & Stocker, 1995; Campbell, 1999). Su reproducción es ovovivípara y su dentición tipo solenoglífa, es decir con un par de colmillos retractiles con un canal cerrado que va de la base al extremo opuesto, terminando en forma de bisel, especializados para la inyección de veneno (Instituto Bioclon, 1997).

La especie *B. asper* mide en promedio 120 a 180 cm cuando es adulta, pero puede llegar a medir hasta 250 cm. Su cuerpo es moderadamente delgado y su cabeza es lanceolada. Es altamente variable en color y patrón. El color de fondo puede ser marrón claro, café, verde olivo, gris, café grisáceo, rosado o casi negro. El dorso de la cabeza usualmente no esta marcado, aunque puede presentar manchas o rayas poco definidas en

la región occipital. La región labial y cantal normalmente no está marcada o está difusamente pigmentada, y son usualmente de color amarillo claro. Una raya post-orbital color café oscuro se extiende desde atrás del ojo hasta el ángulo de la boca e incluso puede llegar hasta 1-2 escamas supralabiales de las más posteriores. La parte ventral de la cabeza es usualmente amarillo claro. El patrón dorsal consiste en series de 18-25 triángulos en cada lado, de color café oscuro a negro con bordes pálidos, con sus bases anchas dirigidas centralmente y sus ápices ya sea opuestos o yuxtapuestos en la línea ventral. Estos triángulos son invadidos centralmente por un color de fondo más claro, usualmente gris cenizo; este color puede extenderse lateralmente y dividir cada triángulo, dejando un par de manchas basales (**ver Anexo 1**) (**Campbell & Lamar, 1989; Campbell, 1999**).

3.1.2. Distribución de *Bothrops asper* (Garman, 1884)

Esta serpiente venenosa conocida comúnmente como barba amarilla, cantil boca dorada o terciopelo, entre otros nombres, se distribuye a lo largo de la vertiente Atlántica de México, desde la parte central al sur de Tamaulipas y hacia al sur en la porción este de la Península de Yucatán; el norte de Guatemala y Honduras, y las tierras bajas del Atlántico de Nicaragua, Costa Rica y Panamá. También es posible encontrar una población aislada en la vertiente del Pacífico de Chiapas y Guatemala (**ver Anexo 2**). En Sur América su distribución incluye la vertiente del Pacífico de los Andes de Colombia, a lo largo de los flancos occidentales y tierras bajas de Ecuador, e inclusive el extremo noroeste de Perú. También habita en la parte norte y central de Venezuela al norte del Río Orinoco, hasta la región del Delta Amacuro (**Campbell & Lamar, 1989; Campbell, 1999; Cisneros-Heredia & Touzet, 2004**).

Es una especie sobre todo de tierras bajas en Mesoamérica (0 a 1300 msnm), aunque en Sur América puede llegar más alto (hasta 2640 msnm) (**Campbell & Lamar, 1989**). Puede ser encontrada en una variedad de hábitats, bosque tropical lluvioso, siempreverde, bosque subtropical, bosque seco y nuboso. En las regiones secas, usualmente esta restringida a la vegetación riparia. Se le encuentra en bosques primarios, aunque es más

abundante en bosques secundarios cercanos a domicilios humanos por los roedores asociados a las poblaciones humanas (**Campbell & Lamar, 1989; Cisneros-Heredia & Touzet, 2004**).

3.1.3. Composición del veneno

El contenido y la potencia del veneno puede variar por factores como el tamaño de la serpiente, edad, clima, la última ingesta y la procedencia geográfica (**Gutiérrez, 1995; Castrillón-Estrada et al. 2007**). El color del veneno varía desde incoloro a amarillento, dependiendo en la cantidad de L-aminoácido oxidasa presente, una enzima con riboflavina como parte de su grupo prostético (**Meier & Stocker, 1995**). Este veneno presenta un complejo de toxinas, péptidos, nucleótidos, aminas biogénicas, carbohidratos, sales, ácidos orgánicos y enzimas coagulantes y procoagulantes tales como serino proteinasas “tipo trombina” y metaloproteinasas que activan los factores X y II de la cascada de coagulación (**Instituto Bioclón, 1997; Gutiérrez, 2002**).

Análisis del veneno han revelado la presencia de proteínas pertenecientes a al menos ocho familias: metaloproteinasas (41-44%), fosfolipasas A₂ o PLA₂ (29-45%), serino proteinasas (4-18%), L-aminoácido oxidasa (5-9%), desintegrinas (1-2%), lectinas tipo C (0.5%), proteína secretora rica en cisteína (0.1%) y fragmento rico en desintegrina y cisteína (<0.1%) (**Alape-Girón et al. 2010; Angulo & Lomonte 2009**). Estas toxinas son responsables de las manifestaciones locales y sistémicas como la inflamación, hemorragia, edema, la miotoxicidad, mionecrosis y nefrotocidad que procede al envenenamiento por *B. asper* (**Castrillón-Estrada et al. 2007**). En este estudio se utilizarán de forma aislada la metaloproteinasa BaP1 y la fosfolipasa A₂ Miotoxina I. A continuación se presenta una breve descripción de estas dos toxinas y su acción.

3.1.3.1. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas dependientes de Zn²⁺ se encuentran de forma abundante en los venenos de serpientes, y son clasificadas en base a la composición del

dominio en cuatro grupos estructurales, de P-I a P-IV. En el veneno de *B. asper* se ha demostrado la presencia de los tres primeros grupos, pero solo representantes de los grupos P-I y P-III han sido aislados (**Alape-Girón et al., 2008; Angulo & Lomonte, 2009**).

La metaloproteinasa BaP1, de 24 kDa (pI=8.5), es una toxina hemorrágica débil del grupo P-I, subclase Ic, clasificación que se refiere a su peso molecular entre 20000 y 30000 Da y a su actividad hemorrágica muy baja. La BaP1 esta presente en relativamente grandes cantidades en el veneno de *B. asper*. Es una metaloproteinasa dependiente de zinc, termolabil a temperaturas mayores de 60°C, que hidroliza fibrinógeno, fibronectina, laminina y colágeno tipo I y IV. Presenta actividad formadora de edema y proteolítica fuerte, es ligeramente miotóxica, y carece de efecto coagulante y defibrinante, y no es letal incluso a dosis mayores de 5 µg/g de peso (**Rucavado et al. 1995; Gutiérrez et al. 1995**). También se ha demostrado que además de hemorragia en músculo y tejido adiposo, la BaP1 induce necrosis moderada de las fibras musculares esqueléticas en modelos de ratón (**Rucavado et al. 1995**). Otras actividades de esta toxina incluyen dermonecrosis y formación de ampollas, activación del complemento, e inducción de la respuesta inflamatoria incluyendo el reclutamiento de leucocitos, hipernocicepción e inducción de la síntesis de metaloproteínas de matriz y citoquinas (**Angulo & Lomonte, 2009; Rucavado et al., 2002**).

El mecanismo de acción hemorrágica de estas toxinas no está totalmente dilucidado. Sin embargo, los estudios efectuados proponen como hipótesis que debido a que estas enzimas son metaloproteinasas dependientes de zinc, hidrolizan algunas proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y de las vénulas. Esto llevaría al desarrollo de una serie de vesículas y reducción del grosor, interrumpiendo la integridad y produciendo rupturas a través de las cuales se produce la extravasación o hemorragia *per rhexis* (**Franceschi et al., 2000; Gutiérrez, 2002**). Aún no esta claro si la degeneración de las células endoteliales observada *in vivo*, es debida a la acción citotóxica directa de

las toxinas hemorrágicas o alternativamente por un mecanismo indirecto desconocido, ya que *in vitro* los efectos de la BaP1 sobre células endoteliales humanas y murinas han demostrado no ser directamente citotóxicas (**Gutiérrez, 2002**). Rucavado *et al.* (1995) sugieren que la primera acción de la BaP1 es degradación proteolítica de los componentes de la membrana basal de los capilares, y que la degradación de las células endoteliales *in vivo* es un evento secundario resultado de la desregulación en la interacción entre células endoteliales y los alrededores de la membrana basal.

Otras metaloproteinasas presentes en el veneno de *B. asper* son BaH1, BH2, BH3, G e I. Las primeras tres son proteínas ácidas con actividad hemorrágica en ratón (**Borkow, Gutiérrez & Ovadia, 1993**). Mientras que las proteinasas G e I, a pesar de tener actividad proteolítica no inducen hemorragia (**Aragón-Ortiz & Gubensek, 1987**).

3.1.3.2. Fosfolipasas A₂

El veneno de *B. asper* contiene una proporción significativa de enzimas fosfolipasas A₂ (PLA₂), tanto ácidas como básicas. Las formas básicas son las más abundantes y se ha demostrado que son las principales responsables del cuadro mionecrótico inducido por el veneno completo de *B. asper* (**Angulo & Lomonte, 2009**). Las PLA₂ básicas pueden dividirse en dos subgrupos según la secuencia de aminoácidos: aquellas que presentan aspartato en el residuo 49 (Asp49) y las que presentan lisina en dicha posición. Esta diferencia tiene implicaciones drásticas en la catálisis, ya que el Asp49 juega un papel central en la capacidad de estas proteínas de unir el ion calcio, el cual es requisito para la actividad catalítica al estabilizar el intermediario tetraédrico característico de esta reacción (**Gutiérrez, 2002**).

El veneno de *B. asper* contiene miotoxina I y III, ambas con Asp49; y las miotoxinas II y IV con Lys49 (**Gutiérrez et al., 2009**). Estas toxinas, además del efecto miotóxico *in vivo*, producen edema, acción anticoagulante *in vitro*, inducción

de citoquinas, acción citotóxica, efecto bactericida, inducción de hiperalgesia, activación de macrófagos, efectos apoptóticos, receptores KDR/VEGF, y contracción de vasos linfáticos (**Angulo & Lomonte, 2009**)

Las observaciones experimentales indican que el ataque inicial de las miotoxinas de *B. asper* sobre la fibras musculares ocurren en la membrana plasmática, con una rápida y drástica perturbación en la integridad del sarcolema, 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 & Ownby, 2003**). Estas miotoxinas también se ha visto tienen la habilidad de afectar la integridad de la membrana celular de una variedad de tipos celulares además de las musculares. Aun no se conoce a detalle los mecanismos por los cuales las miotoxinas afectan la integridad del plasma celular, pero se sabe que hay involucrados eventos dependientes e independientes del sitio de catálisis fosfolipasa A₂ (**Gutiérrez, 2002; Gutiérrez et al., 2009**).

En el caso de la miotoxina I, catalíticamente activa, al igual que la miotoxina III, la hidrólisis de fosfolípidos juega un rol importante pero no único en la desestabilización de la membrana plasmática de la fibra muscular, ya que al ser inhibida la actividad fosfolipasa A₂ su miotoxicidad disminuye drásticamente, pero no desaparece por completo (**Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997**). Esto sugiere que una región molecular distinta al sitio catalítico es capaz de interactuar y afectar la integridad de la membrana plasmática de la fibra muscular. La identidad de esta región molecular aun permanece desconocida, aunque es probable que este comprendida de residuos catiónicos e hidrofóbicos similares a los presentes en el C-terminal de las miotoxinas con Lys49 (**Gutiérrez et al., 2009**).

3.1.4. Patología del envenenamiento

Dependiendo de las circunstancias del accidente (cantidad de veneno inoculado, el sitio anatómico de la mordedura, peso, talla y estado fisiológico general de la persona

mordida) la severidad del envenenamiento puede variar. Esta puede ir de leve a grave con efectos locales inmediatos y, en los casos moderados y severos, con alteraciones sistémicas. La sintomatología asociada al daño local es de edema, dolor, sangrado y necrosis, mientras que las posibles alteraciones sistémicas son náuseas, hematuria, oliguria, sangrado gingival, coagulopatías, choque cardiovascular, hemorragia, hipotensión e insuficiencia renal aguda (**Gutiérrez, 1995; Gutiérrez, 2002; Castrillón-Estrada et al., 2007**). Los daños locales característicos como mionecrosis, hemorragia y edema inician 1 a 20 minutos después de la mordedura. Las alteraciones sistémicas como hemorragia, coagulopatías, disfunción renal y choque cardiovascular tienen lugar usualmente entre 1 a 6 horas después de la inyección del veneno (**Castrillón-Estrada et al., 2007**).

El edema es la consecuencia más común del envenenamiento. El veneno afecta directamente las células endoteliales promoviendo el escape de plasma al intersticio. Así mismo, el veneno induce la liberación de mediadores a partir de precursores endógenos (**Gutiérrez, 1995; Gutiérrez, Rojas & Aymerich, 2005**). En ratas y ratones se ha visto que el edema sigue un patrón de dos fases, una fase inicial rápida producida por mediadores como histamina y serotonina, y una segunda fase más tardía mediada por prostaglandinas (**Badilla et al., 2006; Chaves, Barbosa & Gutiérrez, 1995**). La liberación de histamina, serotonina y prostaglandinas se da por la acción de componentes como proteasas tipo “calicreina” (quininogenasas o liberadoras de quinina) y PLA_2 (**Gutiérrez, 1995**).

La mionecrosis se da a nivel local en envenenamientos moderados y severos. Esta se debe a la acción de miotoxinas con estructura PLA_2 . Estas inducen daño celular muscular agudo por la disrupción directa de la integridad de la membrana plasmática de las células del músculo esquelético, ocasionando una entrada masiva de calcio al citoplasma. Este aumento de calcio intracelular es responsable de una gran cantidad de alteraciones que pueden llevar a las células a una lesión irreversible (**Gutiérrez, Rojas & Aymerich, 2005**). Probablemente las células musculares son también afectadas por la isquemia que resulta de la hemorragia e hinchazón, contribuyendo a incrementar la

extensión de la necrosis muscular. No existe evidencia de miotoxicidad sistémica (**Gutiérrez, 1995; Rucavado et al, 1995**). Se ha reportado que la necrosis del tejido muscular es seguida por una pobre respuesta de regeneración probablemente como resultado del daño a la microvasculatura producida por las toxinas hemorrágicas, lo cual deja una serie de secuelas permanentes, como disfunción del tejido y pérdida importante de masa muscular (**Gutiérrez & Lomonte, 2003**).

La hemorragia ocurre a nivel local y, en casos moderados a severos, también a nivel sistémico. Localmente la hemorragia es causada por la acción de toxinas hemorrágicas y metaloproteínas dependientes de zinc que degradan los componentes de los vasos capilares y vénulas del sitio afectado, y como consecuencia los capilares colapsan y se produce extravasación. A nivel sistémico, estas mismas toxinas pueden llegar a afectar los capilares de múltiples órganos, originando un sangrado sistémico (gingivorrea y hemoptisis son comúnmente observadas). En casos severos puede llegar a ocurrir accidente cerebro vascular, hipovolemia y choque cardiovascular (**Gutiérrez, 1995; Gutiérrez, Rojas & Aymerich, 2005**). Se ha encontrado que los venenos de serpientes de *B. asper* recién nacidas son más hemorrágicos, edematizantes y letales que los venenos de serpientes adultas, los cuales son más hemolíticos y mionecróticos (**Gutiérrez, Chaves & Bolaños, 1980; Chaves, Gutiérrez & Brenes, 1992; Castrillón-Estrada et al., 2007**).

Las coagulopatías que induce el veneno de *B. asper* agravan los cuadros de sangrado sistémico. El veneno produce una desfibrinación, con la disminución de los niveles de fibrinógeno y con prolongación de los tiempos de coagulación, de protrombina y tromboplastina parcial (**Borrantes, Solis & Bolaños, 1985; White, 2005**). Por otra parte, el veneno también afecta el número y funcionalidad de las plaquetas. En modelos de ratón Rucavado *et al.* (**2005**) demostraron que hay una reducción del número de plaquetas circulantes, o trombocitopenia, debido al efecto de diversas toxinas, principalmente la aspercetina, una proteína de la familia de las lectinas tipo C que induce la agregación plaquetaria. Así también, observaron que otros componentes del veneno, como las enzimas defibrinantes jararacussin-I (una proteinasa de tipo trombina) y

basparin A (una metaloproteínasa activadora de protrombina), indujeron hipoagregación plaquetaria.

Puede haber insuficiencia renal aguda en el caso de envenenamientos severos. Las principales causas del daño renal son la hipovolemia y la inadecuada perfusión renal, como consecuencia de la pérdida de sangre y posiblemente por la acción de toxinas en las células de los túbulos renales. En estos casos, usualmente a las seis o más horas después de la mordida aparece oliguria o anuria. Estudios de patología en humanos han demostrado la presencia de nefrosis de las nefronas distales, necrosis tubular aguda y necrosis cortical (**Gutiérrez, 1995; Gutiérrez, Rojas & Aymerich, 2005**).

3.2. Matriz Extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una compleja red de proteínas y polisacáridos que contribuyen a la estructura y funcionamiento de los tejidos. La MEC no solo une a las células entre sí y provee soporte mecánico, tiene otras funciones diversas. Esta ayuda a organizar las células en tejidos y a coordinar las funciones celulares activando vías de señalización y de control de crecimiento celular, proliferación y expresión genética. Así también, la MEC provee un entramado por el cual las células se pueden mover, especialmente en las primeras etapas de conformación del tejido (**Lodish et al., 2003**).

La matriz está compuesta de una gran variedad de moléculas que incluyen a la familia del colágeno, elastina, glicoproteínas adhesivas (*e.g.* fibronectina, laminina, vitronectina), proteoglicanos y glicosaminoglicanos (**Lodish et al., 2003; Lewin et al., 2006**). Estos componentes son secretados localmente y ensamblados en una red organizada en asociación cercana con la superficie de las células que los producen. Las diferentes combinaciones, inmovilización y organización espacial de estas moléculas dan como resultado diferentes tipos de tejidos y órganos (**Lodish et al., 2003; Karp, 2006**).

La familia del colágeno consiste de más de 20 diferentes proteínas de la matriz extracelular, que juntas son las proteínas más abundantes del reino animal. Todas se

caracterizan por estar organizadas en una triple hélice de espirales enrollados compuesta por tres subunidades de colágeno, unidas por enlaces covalentes y no covalentes. La organización que toman los colágenos forma el principal andamio de la matriz extracelular del tejido. Otras proteínas de matriz se unen al colágeno y siguen el patrón establecido por ellos. De ahí que la función principal de los colágenos es proveer soporte estructural a los tejidos (**Lewin et al., 2006**).

La elastina por su parte, es la responsable primaria de impartir elasticidad a los tejidos. La elastina se organiza en fibras elásticas que al combinarse con los colágenos dan flexibilidad y fuerza a la MEC de cada órgano (**Karp, 2006**).

La fibronectina es una proteína con al menos 20 isoformas cuya principal función es conectar las células a matrices que contengan colágeno fibrilar. Otras funciones de esta proteína es regular la forma y la organización del citoesqueleto de las células que conecta, asistir en la formación de coágulos sanguíneos, y ayudar a controlar el comportamiento de varias células durante el desarrollo y reparación de heridas (**Uitto & Larjava, 1991; Karp, 2006**). En los sitios de lesiones, la fibronectina se une a las plaquetas durante la coagulación sanguínea, y más tarde en la reparación de la herida, asiste la migración de nuevas células al área a reparar. Así también las lamininas tienen la función de proveer un sustrato de adhesión para las células y la de resistir fuerzas tensiles en los tejidos. Al igual que las fibronectinas, estas influyen notablemente el potencial migratorio, crecimiento y diferenciación de las células (**Karp, 2006**).

La vitronectina es otra glicoproteína adhesiva que se le encuentra circulando en el plasma sanguíneo y en heridas y áreas donde hay remodelación de tejidos (**Uitto & Larjava, 1991**). Esta glicoproteína tiene la habilidad de unirse a muchos otros tipos de proteínas, incluyendo colágenos, receptores de integrina, factores de coagulación, factores de lisis de la respuesta inmune, y a proteasas involucradas en la degradación de la MEC. En lugares donde hay daño tisular la vitronectina facilita la coagulación sanguínea (**Lewin et al., 2006**).

Los proteoglicanos son más de 40 diferentes polipéptidos unidos a glicosaminoglicanos. La función de estos es la de atraer agua para formar geles que mantengan hidratadas a las células y que a la vez provea a los tejidos de resistencia a la compresión (**Karp, 2006**). Entre los glicosaminoglicanos que conforman la MEC se encuentra el ácido hialurónico. Este forma enormes complejos con los proteoglicanos en la MEC. Al tener una carga altamente negativa ayuda a los proteoglicanos a aglutinar moléculas de agua (**Lewin *et al.*, 2006**).

3.3. Metaloproteinasas de Matriz

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) constituyen una gran familia de enzimas proteolíticas que median la degradación de varios componentes de la MEC. Estas enzimas son endopeptidasas dependientes de calcio y zinc que funcionan principalmente de forma extracelular. Son importantes factores de regulación en un amplio rango de actividades que incluyen el mantenimiento de la MEC. Las MMP degradan gran cantidad de sustancias en la MEC para facilitar la migración de células, la deposición de nueva MEC, y el desarrollo de nuevo tejido (**Armstrong & Jude, 2002; Carmeli *et al.*, 2004**). Colectivamente son responsables de la degradación de la MEC durante el desarrollo embrionario, la migración celular, morfogénesis y remodelación de tejidos. Así mismo, juegan un papel esencial en el funcionamiento normal de diversos tejidos durante el crecimiento, desarrollo y envejecimiento, o están involucradas en procesos como remodelación de hueso, funcionamiento del útero y glándulas mamarias y la ovulación. Las MMP también participan en varios procesos fisiológicos y patológicos que involucran a la MEC, incluyendo la inflamación, angiogénesis, invasión celular, enfermedades del riñón, progresión de tumores, metástasis, mala cicatrización y muerte celular (**Nagase & Woessner, 1999; Carmeli *et al.*, 2004; Murphy & Nagase, 2008**).

La actividad de las MMP parece estar controlada en tres niveles básicos: (1) a nivel genético por control transcripcional; (2) a nivel molecular, al necesitar factores que conviertan la proenzima en la forma activa; y (3) a través de enzimas de tejido inhibitoras de metaloproteinasas (las TIMP por sus siglas en inglés) (**Armstrong & Jude, 2002**). Las

MMP son inducidas por factores de crecimiento, citoquinas, estrés físico y algunos agentes químicos (*e.g.* ésteres de forbol). Además, son activadas, unas pocas por furina, y la mayoría por otras proteasas y por agentes no proteolíticos como compuestos mercuriales y oxígeno reactivo (**Johnson, Dyer & Hupe 1998; Nagase & Woessner, 1999**). La compleja interacción entre las MMP, otros receptores y mediadores circulantes en la MEC, resulta en un eficiente mantenimiento de la matriz. No obstante, fallas en la regulación de las MMP están relacionadas con numerosos procesos patológicos como cáncer, heridas crónicas distrofias musculares, artritis, ulceraciones en piel, nefritis, fibrosis en el hígado y pulmón, entre otras (**Johnson, Dyer & Hupe 1998; Nagase & Woessner, 1999; Armstrong & Jude, 2002**).

Hasta el momento se han identificado y caracterizado al menos 23 MMP diferentes, cada una con especificidad a un sustrato diferente (**Murphy & Nagase, 2008**) (ver Anexo 3). De acuerdo a esta especificidad de sustrato, estas se pueden agrupar en al menos 4 tipos de enzimas (**Villalonga, 2001; Armstrong & Jude, 2002; Lewin *et al.*, 2006**): las colagenasas, las gelatinasas, las estromelisininas y de tipo estromelisinina, y las MMP de membrana. Entre las colagenasas se encuentran la MMP-1, MMP-8 y MMP-13. Estas tienen la capacidad de adherirse a la triple hélice del colágeno fibrilar (con mayor afinidad al colágeno tipo I, II y III) y son secundariamente activas con otros materiales en la matriz extracelular. Las gelatinasas comprenden la MMP-2 y la MMP-9 que se adhieren preferentemente a colágeno tipo IV, V, VII, y X; degradan elastina, fibronectina, basamento de membranas y colágeno desnaturalizado. Las estromelisininas y las de tipo estromelisinina (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-26) han sido asociadas a la degradación de colágeno tipo IV, V, IX y X; elastina, fibronectina, vitronectina; y algunos proteoglicanos. Finalmente, las MMP de membrana (MMP-14 o MT1-MMP, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25) se encuentran en las membranas celulares y parecen funcionar ligándose a otras metaloproteinasas de matriz, activándolas o ayudándolas a localizar su actividad en esa membrana específica.

Es de especial interés para esta investigación las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 por lo que a continuación se presenta más detalle sobre estas MMP.

Las gelatinasas difieren de otras MMP en que el dominio catalítico se encuentra separado del dominio tipo hemopexina por un dominio de tipo fibronectina que contribuye a la especificidad de sustrato. La MMP-9 posee además un dominio de tipo colágeno (Nguyen, Arkell & Jackson 2001; Gioia *et al.*, 2009). La expresión de la MMP-9 *in vivo* se restringe principalmente a células inflamatorias y endoteliales, y está relacionada a estados patológicos como artritis inflamatoria, úlceras en la córnea, y la enfermedad de Alzheimer (Nguyen, Arkell & Jackson 2001; Murphy & Nagase, 2008). La MMP-2 se expresa constitutivamente en varios tipos celulares, generalmente de origen fibroblástico, células endoteliales y células tumorígenas; no así la MMP-9 cuya expresión y secreción por células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos y linfocitos) es altamente regulada (Kherif *et al.*, 1999; Carmeli *et al.*, 2004; Gioia *et al.*, 2009). La expresión de la MMP-9 es regulada principalmente a nivel transcripcional, mientras que la MMP-2 esta regulada principalmente a nivel de activación de la proenzima e inhibición por las TIMP. La activación de la MMP-2 ocurre en la membrana celular y es mediada por MT1-MMP y TIMP-2, aunque también se ha visto que la proteína C endotelial activada puede activar directamente a la pro-MMP2 en la ausencia de células (Nguyen, Arkell & Jackson, 2000; Ruangpanit *et al.*, 2001; Itoh & Seiki, 2004). Mientras que la activación de la pro-MMP-9 se da a través de cascadas de activación de otras MMP, incluyendo la MMP-2 activada a través de la MT1-MMP (Toth *et al.*, 2003) y la MMP-3 activada por plasmina (Ramos-Desimone *et al.* 1999).

Las MMP de membrana tienen una secuencia en el C-terminal que reconoce furina para su activación. Estas son activadas intracelularmente y expresadas en su forma activa en la superficie celular (Murphy & Nagase, 2008). La MT1-MMP tiene un dominio catalítico, un dominio tipo hemopexina y un dominio transmembrana. La enzima activada es inhibida por TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Entre estas la TIMP-2 tiene un rol dual al inhibir la MT1-MMP y promover la activación de proMMP-2. En este proceso una MT1-MMP forma un complejo inhibitorio con TIMP-2, la cual se une a la proMMP-2 por su dominio hemopexina. De esta forma la proMMP-2 queda en una posición óptima para que otra MT1-MMP en la proximidad la active (Itoh & Seiki, 2004). Adicionalmente, la MT1-MMP también puede actuar junto a varias serino proteinasas, como trombina y plasmina,

para activar la proMMP-2 (Zucker *et al.*, 1995; Nguyen, Arkell & Jackson, 1999; Pekovich, Bock & Hoover, 2001; Shamamian *et al.*, 2001). La MT1-MMP tiene actividad catalítica contra varios componentes de la MEC como colágeno tipo I y II, fibronectina, vitronectina, laminina, fibrina y proteoglicanos (Souni *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2003). Esta enzima ha sido propuesta como crítica en roles fisiológicos y procesos patológicos como cicatrización de heridas, desarrollo de huesos, angiogénesis, inflamación, artritis reumatoide, aterosclerosis y cáncer (Holbeck *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Souni *et al.*, 2002; Seiki, 2003).

3.3.1. Rol de las MMP en el músculo esquelético durante la regeneración

La cicatrización de heridas se caracteriza por ser una secuencia de eventos altamente organizados, en la que actúan diferentes células, componentes de la MEC y moléculas biológicamente activas para reestablecer la integridad del tejido (Kössi *et al.*, 2001). En caso de lesión del músculo esquelético la regeneración se da en dos fases: una fase degenerativa donde se induce inflamación y la necrosis de las miofibras afectadas; y una fase regenerativa donde se da la proliferación de mioblastos, la diferenciación, elongación y fusión de los mismos en miotubos (Chargé & Rudnicki, 2004; Ohtake, Tojo & Seiki, 2006). Células musculares satélite, es decir células musculares indiferenciadas que se encuentran en la musculatura esquelética (entre la lámina basal y el plasmalema), son activadas tras la lesión y actúan como precursores de mioblastos, regenerando las miofibras por un proceso similar al de la miogénesis embrionaria (Musaro *et al.*, 2007). Esta regeneración resulta de la activación, proliferación y fusión de mioblastos mononucleados en miotubos centralmente multinucleados que maduran en miofibras (Kherif *et al.*, 1999; Chargé & Rudnicki, 2004). Durante la fusión de mioblastos se da una remodelación de la MEC, en donde en ratones y cultivos celulares se ha visto que las MMP están involucradas (Kherif *et al.*, 1999; Ohtake, Tojo & Seiki, 2006).

En la investigación llevada a cabo por Kherif *et al.* (1999), sobre la expresión de MMP-2 y MMP-9 en músculo esquelético en regeneración de ratones tratados con

cardiotoxina y ratones mdx, correlacionan la expresión de MMP-9 con la respuesta inflamatoria y con la activación de células satélite; mientras que la activación de la MMP-2 es concomitante con la regeneración de las miofibras. En otro estudio llevado a cabo en cultivos celulares y ratones genéticamente deficientes en MT1-MMP (**Ohtake, Tojo & Seiki, 2006**) se identificó la actividad de la MT1-MMP como un punto de chequeo crítico en la fase de elongación de los mioblastos como prerrequisito para completar su fusión. Esto sería a través de su actividad proteolítica sobre la fibronectina, un posible factor de inhibición de la fusión de células miogénicas. A su vez, la presencia de MT1-MMP es necesaria para la activación de la MMP-2, e indirectamente para la activación de MMP-9 vía MMP-2 activada (**Shamamian et al., 2001; Toth et al., 2003; Itoh & Seiki, 2004**).

No obstante su importante papel en la regeneración del músculo esquelético, la sobreexpresión de estas mismas gelatinasas está asociada a procesos patológicos del tejido. Por ejemplo, tanto la MMP-2 como la MMP-9 son altamente sobreexpresadas en heridas por isquemia/reperfusión, lo que conlleva degradación de la lámina basal que se correlaciona con una mayor severidad en el daño tisular (**Roach et al., 2002; Muhs et al., 2003**). También se ha demostrado que en distrofia muscular la MMP-9 se encuentra sobreexpresada y que su inhibición en ratones mdx, modelo de distrofia muscular en murinos, aumenta significativamente la regeneración muscular y mejora la patogénesis del músculo esquelético (**Li et al., 2009**). De igual forma hay evidencia de que diferentes patrones de activación de la MMP-9 y MMP-2 pueden llevar a diferentes resultados de regeneración muscular (**Zimowska et al., 2008**)

Por otra parte, estas tres metaloproteinasas de matriz tienen un papel importante en la revascularización y angiogénesis (**Muhs et al., 2003; Carmeli et al., 2004**), lo cual favorecería la regeneración del tejido. La angiogénesis requiere la invasión de células endoteliales y la modificación proteolítica de la MEC. La proteólisis de la MEC, mediada las MMP, permite la migración de células y la liberación moléculas señalizadoras almacenadas en la misma (**Vu et al., 1998; Kiran et al., 2006**). Las dos gelatinasas y la MT1-MMP han sido implicadas en este proceso de modificación de la MEC (**Vu et al.,**

1998; Nguyen, Arkell & Jackson, 2001; Souni *et al.*, 2002; Carmeli *et al.*, 2004). Sin embargo, una proteólisis excesiva también puede llevar a la desintegración de la MEC mínima necesaria para el anclaje de las células migrantes, anulando así la angiogénesis (van Hinsbergh, Engelse & Quax, 2006).

3.3.2. Expresión y activación de las MMP en envenenamiento por serpiente

El veneno de serpientes puede contener altas concentraciones de metaloproteinasas, algunas de las cuales inducen hemorragia afectando directamente a los capilares sanguíneos, lo cual secundariamente produce daño severo al músculo esquelético. Las metaloproteinasas del veneno de serpiente juegan un rol importante en la respuesta inflamatoria local, induciendo edema y activando MMP endógenas capaces de liberar TNF- α de su precursor anclado a la membrana (Carmeli *et al.*, 2004). Las metaloproteinasas del veneno pueden ser las responsables de la fibrosis y cicatrices después del envenenamiento por serpiente.

Estudios acerca del envenenamiento por *B. asper* en ratones indican que la inyección de BaP1 y miotoxina III aumentan la expresión y, en algunos casos la activación de (MMP-2 y MMP-9) (Rucavado, Nuñez & Gutiérrez, 1998; Rucavado *et al.*, 2002; Saravia-Otten *et al.*, 2004). Sin embargo aun no hay evidencias conclusivas sobre el papel que estas MMP juegan en la patogénesis del envenenamiento.

En el estudio de Rucavado, Nuñez y Gutiérrez. (1998) encontraron la presencia de proformas y formas activadas de MMP-2 y MMP-9 en exudados de homogenizados de piel de ratones inyectados con BaP1. Ellos sugieren que la activación de las MMP en concierto con BaP1 podría ser un componente importante en la patogénesis del daño local del tejido característico de este tipo de envenenamiento. No obstante, en un estudio posterior en donde inyectaron a ratones con BaP1 y miotoxina III aisladas del veneno de *B. asper*, encontraron que ambas toxinas inducen el incremento principalmente de la forma latente de MMP-9 y en cierta medida de la forma activada en las primeras 6 horas tras la inyección de las toxinas, pero este incremento no demostró tener consecuencias

en la hemorragia ni en la dermonecrosis inducidas por las toxinas del veneno. Esto sugiere que la respuesta inflamatoria y la MMP-9 no están involucradas en el daño local tras el envenenamiento al menos en el modelo utilizado por los autores donde parece tratarse de una lesión aguda caracterizada por un controlado balance de las MMP y sus inhibidores (**Rucavado *et al.*, 2002**). No obstante en heridas crónicas este fino balance entre las enzimas y sus inhibidores puede verse desestabilizado, dando lugar a una prominente degradación de la MEC y a daño del tejido (**Trengrove *et al.*, 1999**).

Por otra parte, Saravia-Otten *et al.* (2004) encontró que, en músculo esquelético de ratón, en cultivo celular y en un sistema libre de células, el veneno de *B. asper* induce la activación de MMP-2 sin estimular la síntesis de proMMP-2. Además sus resultados sugieren que las serino proteinasas del veneno activan la MMP-2, mientras que las metaloproteinazas degradan esta misma enzima. Más aun, demuestra que las serino proteinasas del veneno activan a las MMP-2 independientemente de la presencia de membranas celulares. Esto sugiere que una vez el veneno es inyectado, la proMMP-2 es activada directamente y de forma independiente de sus reguladores fisiológicos. La importancia de estos resultados en la patogénesis local del envenenamiento y en la regeneración muscular aun no ha sido dilucidada.

4. JUSTIFICACIÓN

La patogénesis del envenenamiento por mordedura de *B. asper* se manifiesta a nivel local por necrosis del tejido muscular (Gutiérrez, 1995) seguida por una pobre respuesta de regeneración. Esto último se traduce en secuelas permanentes, como disfunción del tejido y pérdida importante de masa muscular (Gutiérrez & Lomonte, 2003). Dado que la localización de la mordedura en la mayor parte de casos es en alguna extremidad, los daños permanentes pueden llegar a tener un alto costo para las personas afectadas, especialmente cuando resulta en incapacidad para realizar actividades cotidianas y de labor del campo.

Las causas de la regeneración muscular deficiente no han sido esclarecidas, pero estudios previos sugieren que se debe a alteraciones profundas en la microvasculatura causadas por las metaloproteinasas del veneno (Gutiérrez, 1995) y que la activación de las metaloproteinasas de matriz (MMP) puede ser un componente implicado en la patogénesis del daño local del tejido (Rucavado, Nuñez & Gutiérrez, 1998; Kiran *et al.*, 2006). Varias MMP son asociadas con el mantenimiento y la regeneración del músculo esquelético, especialmente la MMP-2, MT1-MMP y MMP-9 que juegan un papel esencial en la proliferación de miofibras, angiogénesis y formación de miotubos después de una lesión. Sin embargo, alteraciones en la regulación de la expresión y activación de estas metaloproteinasas han sido asociadas a heridas crónicas (Soo *et al.*, 2000; Kiran *et al.*, 2006).

Es por ello que esta investigación se dedicó a estudiar la expresión y activación de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 a través del proceso regenerativo del músculo esquelético después de la necrosis inducida por el veneno de *B. asper*, y a esclarecer si tienen o no una relación con la regeneración incompleta del músculo. Los resultados encontrados ayudan a comprender mejor la patogénesis local del envenenamiento por *B. asper*. Por tanto, la información generada es un paso más hacia el planteamiento de estudios enfocados al desarrollo de tratamientos específicos después del envenenamiento que permitan evitar o minimizar las secuelas permanentes y el costo económico que estas representan para las personas afectadas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar los patrones de expresión y activación de las metaloproteínas de matriz MMP-2 y MMP-9 durante el proceso regenerativo del músculo esquelético en ratón después de la necrosis inducida por el veneno crudo y toxinas aisladas de *B. asper* y si existe diferencias entre tratamientos.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1. Estudiar el efecto del veneno crudo y de las toxinas aisladas BaP1 y miotoxina I, en la expresión y activación de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 en músculo de ratón durante el proceso de regeneración muscular.
- 5.2.2. Evaluar histológicamente la regeneración muscular en gastrocnemio de ratón a varios intervalos de tiempo después de la inyección del veneno crudo y de las toxinas aisladas BaP1 y miotoxina I.
- 5.2.3. Comparar el estado de la regeneración muscular mostrado histológicamente con el patrón de expresión de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 obtenidos para cada uno de los tratamientos estudiados.

6. HIPÓTESIS

La inyección intramuscular de veneno crudo y de su toxina aislada BaP1 en el gastrocnemio de ratón produce un patrón temporal de expresión y activación de las MMP, durante el proceso de regeneración después de la necrosis inducida, distinto al de la inyección con Mtx-1, y esto tiene un efecto directo en la capacidad de recuperación del tejido muscular tras la lesión.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

La experimentación se realizó en ratones Swiss Webster. Para cada tratamiento se seleccionaron por conveniencia 24 ratones al azar con pesos entre 18 y 20 gramos. Para el estudio de la expresión de las MMP se establecieron 5 tiempos de control (1, 3, 5, 7 y 15 días post-inyección), y para el análisis histológico de la regeneración 3 tiempos (1, 5 y 7 días post-inyección). En cada punto de control se sacrificaron 3 ratones para cada análisis.

7.2. MATERIALES

7.2.1. Venenos y toxinas

El veneno de *Bothrops asper* que se utilizó en los experimentos lo proporcionó el serpentario del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. Este se trataba de una mezcla de por lo menos 40 ejemplares adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica. El veneno se mantuvo liofilizado a -20° C hasta el momento de su utilización. Además del veneno crudo, se usaron las toxinas purificadas del veneno BaP1 y Mtx-I donadas también por el Instituto Clodomiro Picado. La BaP1 fue aislada del veneno como se describe en Rucavado, Nuñez y Gutiérrez (1998). La fracción de miotoxina fue aislada del veneno por cromatografía de cambio iónico en CM-Sephadex C-50. Inmediatamente antes de su uso, el veneno y las toxinas fueron disueltos en PBS (NaCl 0.14 M, fosfato 0.04M, pH 7.2) y se esterilizaron por filtración utilizando acrodiscos de 0.2 micrómetros.

7.3. MÉTODOS

7.3.1. Tratamientos

Se inyectaron grupos de 24 ratones en el músculo gastrocnemio derecho con 50 µl de uno de los siguientes tratamientos: (a) 50 µg de veneno crudo de *B. asper*; (b) 50 µg

de BaP1; y (c) 100 µg de Mtx-1. El grupo de animales control fue inyectado únicamente con solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2 (PBS) bajo las mismas condiciones. Adicionalmente para el análisis histológico se llevó a cabo la inyección de una mezcla de 50 µg de BaP1 y 50 µg de Mtx-1 (Mtx-1+BaP1) para evaluar el aporte de estas dos toxinas en la patología causada por la inyección del veneno crudo.

7.3.2. Estudio de la expresión y activación de MMP-2 y MMP-9 en homogenizados de músculo de ratón

Grupos de 3 ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las 24 horas, 3, 5, 7 y 15 días post-tratamiento. Los músculos inyectados fueron disectados y puestos inmediatamente en hielo y almacenados en nitrógeno líquido. Cada músculo se homogenizó en 2 ml de PBS frío y estéril usando un homogenizador de tejido (PT10/35, Brinkmann Instruments Co., USA). Después de 5 min de centrifugación a 6000 X g los sobrenadantes fueron colectados, se combinaron alícuotas iguales de cada músculo (*pool*) y esto se preservó a -80 °C por no más de una semana.

La expresión de las metaloproteinasas (MMP) inactivas y activas en los homogenizados de músculos fue analizada por zimografía en geles de gelatina (Tris-glicina al 10% con 0.1% gelatina, Invitrogen). El mismo volumen de homogenizado de cada *pool* fue separado a 125 V constantes por 90 min. A continuación los geles fueron incubados en solución de renaturalización por 30 min a temperatura ambiente y luego otros 30 min con buffer de desarrollo y agitación leve. Se dejaron incubando toda la noche a 37°C en una nueva alícuota de buffer de desarrollo. Finalmente, los geles se tiñeron con Azul Coomassie R-250 al 0.5% por espacio de 1 hora con agitación leve a temperatura ambiente para luego ser desteñidos con solución decolorante. Para identificar que bandas en los geles de gelatina correspondían a metaloproteinasas, se corrieron geles idénticos bajo las mismas condiciones pero incubados en la presencia de EDTA 20mM para inhibir las metaloproteinasas.

La intensidad de las bandas que representan las formas inmaduras y activadas de MMP-2 y MMP-9 fue cuantificada por densitometría usando el software ImageJ 1.42q (NIH). Los resultados fueron normalizados como la proporción entre la muestra y la

densidad óptica de la banda correspondiente a la proMMP-2 del mismo carril del gel. A la intensidad de la banda correspondiente a proMMP-2 del día 1 post-inyección de PBS le fue asignada el valor de 1.0, y la densidad normalizada de las demás bandas fue expresada en relación a este valor como unidades arbitrarias.

7.3.3. Análisis histológico de la regeneración del tejido muscular

Los músculos de 3 ratones fueron disectados en cada intervalo de tiempo (24h, 5 y 15 días) y fijados en una solución al 10% de formalina/PBS para luego ser embebidos en parafina. Se prepararon cortes de músculo teñidos con hematoxilina-eosina para el análisis histológico. Tres secciones no consecutivas de músculo por animal fueron evaluadas (porción distal, media y proximal) a un aumento de 40X (Motic Image Plus 2.0ML). Se determinó el número total de fibras musculares en cada uno de los 3 escogidos al azar por sección y se calculó el porcentaje de fibras musculares necróticas, normales y en regeneración (con núcleo central).

7.3.4. Diseño Experimental

Se llevó a cabo un diseño experimental al azar en el cual se probaron 4 tratamientos: (a) veneno crudo, (b) BaP1, (c) Mtx-1, (d) y PBS como control. Se inyectaron 24 ratones escogidos al azar para cada uno de los tratamientos y en cada punto de control (día 1, día 5, y día 15 para el análisis histológico, y día 1, día 3, día 5, día 7 y día 15 para el análisis del patrón de expresión de las MMP) se sacrificaron, de nuevo al azar, 3 ratones por tratamiento en cada punto de control para cada uno de los análisis.

En el estudio de la expresión y activación de la MMP-2 y MMP-9 en homogenizados de músculo de ratón, a pesar de contar con resultados cuantitativos, el análisis llevado a cabo fue solo descriptivo, debido al número de réplicas por tratamiento y al método de cuantificación *per se* que presenta varios inconvenientes para un análisis estadístico. Por tanto solo se habla de patrones de expresión y activación para los distintos tratamientos. Los experimentos se repitieron de manera independiente 3 veces por tratamiento para confirmar los resultados. En el análisis

histológico de la regeneración del tejido muscular se llevaron a cabo 3 réplicas independientes por punto de control a las que se les evaluó las siguientes variables: (a) proporción de fibras normales, (b) proporción de fibras necróticas, y (c) proporción de fibras musculares en regeneración. Todas estas variables fueron tomadas como el promedio de los conteos realizados en 9 campos ópticos diferentes para cada músculo de ratón.

7.3.5. Análisis estadístico

Se determinó si existía diferencia estadística significativa entre los valores medios de las variables cuantitativas de los cortes histológicos con un análisis no paramétrico de Friedman. De haber diferencia significativa ($p < 0.05$) se llevó a cabo la prueba *post hoc* de Friedman para rangos medios según Siegel & Castellan (1988).

8. RESULTADOS

8.1. Expresión y activación de MMP-2 y MMP-9 en homogenizados de músculo de ratón

En el análisis de la expresión y activación de las gelatinasas, se interpretó como proMMP-2 las bandas de aproximadamente 72kDa (**Roach *et al.*, 2002**); las bandas de 62 y 50kDa se tomaron como formas activadas de MMP-2 (**Wu & Huang, 2003**). La proMMP-9 y MMP-9 se detectaron a aproximadamente 92 y 88 kDa respectivamente (**Muhs *et al.*, 2003**).

Los animales control inyectados con PBS expresaron la proMMP-2 constitutivamente para todos los tiempos analizados, mientras que bandas gelatinolíticas de proMMP-9 no fueron detectadas en ninguno de los tiempo estudiados (**Figura 1A**).

En los animales tratados con veneno (**Figuras 1B y 2A**), la forma activa de la MMP-2 ya se presentó a las 24 horas post inyección para luego alcanzar sus expresión máxima en el día 7 y 15. La proMMP-9 se encontró expresada durante los primeros 3 días post-inyección, pero en ningún momento llegó a expresarse la forma activada de la MMP-9.

En estudios anteriores se ha reportado que la inyección de la metaloproteinasa hemorrágica BaP1 produce una regeneración deficiente del músculo gastrocnemio del ratón, mientras que la inyección de la Mtx-1 induce una regeneración completa (revisado en **Gutierrez *et al.* 2009**). Por ello, también se estudiaron los patrones de expresión y activación de la MMP-2 y MMP-9 tras la inyección de estas dos toxinas aisladas del veneno.

Los ratones tratados con Mtx-1 (**Figuras 1C y 2B**) mostraron un rápido incremento en la expresión de la MMP-2, alcanzando el máximo en el día 5 post-inyección, continuó con valores altos en el día 7, y desaparece para el día 15. Tanto la proMMP-9, como su

forma activada se encontraron expresadas con valores altos en los primeros 3 días y luego declinaron.

En el caso del tratamiento con BaP1 (**Figuras 1D y 2C**), hubo activación de la MMP-2 alcanzando su pico en el día 7 y declinando hacia el día 15. La proMMP-9 tuvo su valor de expresión máxima a las 24 horas de la inyección y luego tendió a declinar en los días siguientes. Al igual que en el tratamiento con el veneno crudo, no se detectó activación de la MMP-9 en ningún momento del experimento.

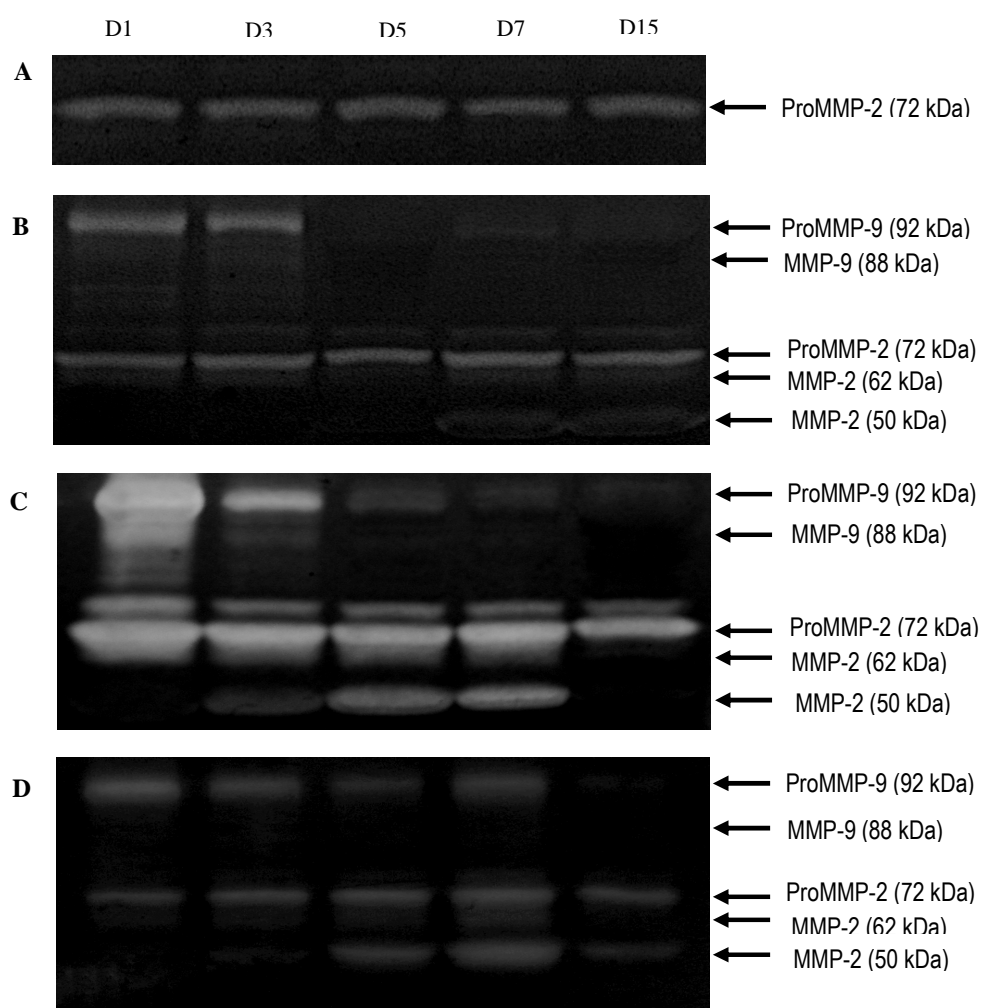


Figura 1. Zimografías en gelatina realizadas con los homogenizados de gastrocnemio de ratón para cada tratamiento. **A:** PBS, **B:** Veneno, **C:** Mtx-1, **D:** BaP1. Fuente: Datos experimentales.

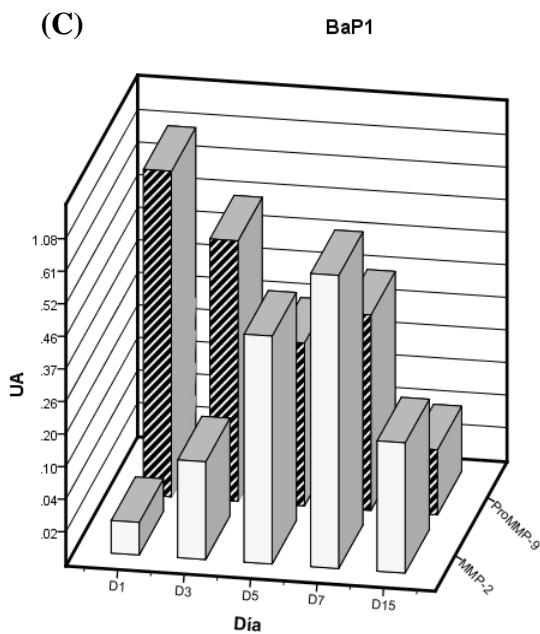
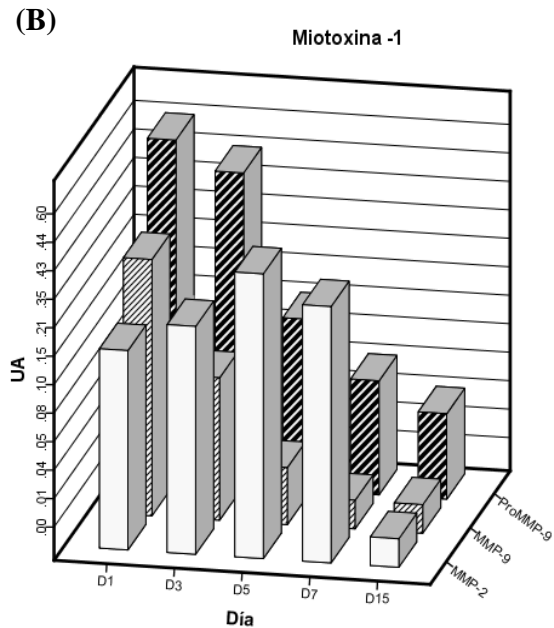
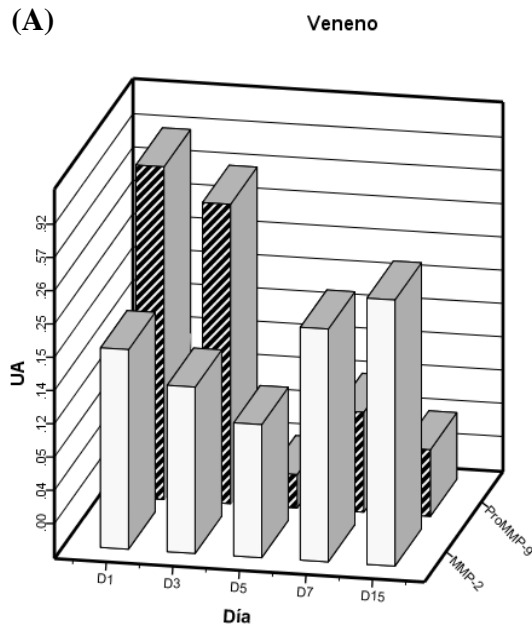


Figura 2. Densitometría de las bandas gelatinolíticas de MMP-2, proMMP-9 y MMP-9 detectadas en los músculos de ratones inyectados con (A) Veneno, (B) Miotoxina- 1, (C) BaP1. Los valores se expresan como unidades arbitrarias (UA).

Fuente: Datos experimentales.

8.2. Daño y regeneración del tejido muscular en cortes histológicos

En los cortes de gastrocnemio de los ratones inyectados se observaron los hallazgos esperados para cada tratamiento (Gutiérrez *et al.* 2009; Hernández *et al.*, 2011) (Figura 3). Los ratones inyectados con PBS no mostraron cambios importantes en la arquitectura ni

en la citología del músculo estriado. Algunas veces se observaron ligeros cambios como irregularidad leve y focal de estriaciones, pero en general los cortes histológicos de estas muestras pueden considerarse sin anormalidades diagnósticas.

Los ratones tratados con veneno presentaron necrosis coagulativa con hemorragia en los primeros 3 días, pero que fue cediendo con el paso de los días hasta llegar a ser ausente o muy focalizada en el día 15. Así mismo la necrosis estuvo acompañada desde el inicio con infiltrado inflamatorio, principalmente polimorfonucleares en un inicio que fueron sucedidos por linfocitos y macrófagos con el pasar de los días. Fue común encontrar formaciones de agregados linfoides en el epimisio. Los cambios regenerativos (miocitos con núcleo central y/o multinucleación y/o fibrosis del endomisio) empezaron a ser notorios a partir del día 5 post-inyección.

En el tratamiento con Mtx-1, se observó una mionecrosis coagulativa bastante extensa y marcada sobre todo en el primer día con poca o ninguna hemorragia focal reciente. La mionecrosis disminuyó en los días siguientes y para el día 7 era ausente o menor al 15%. El infiltrado inflamatorio fue leve, con polimorfonucleares predominando en los primeros 3 días y luego mononucleares. En algunas ocasiones se observó agregados linfoides en el epimisio. Los cambios regenerativos se comenzaron a ver en el día 3, pero fueron más notorios a partir del día 5.

Los cortes histológicos de los ratones tratados con BaP1 mostraron una mionecrosis coagulativa menor que veneno y Mtx-1 a las 24 horas post-inyección, pero presentaba necrosis fibrinoide de las paredes de vasos sanguíneos y hemorragia reciente. La mionecrosis fue mayor en el día 3 y fue disminuyendo en los días consecutivos. El infiltrado inflamatorio fue principalmente polimorfonuclear en los primeros 3 días y en los días siguientes en su mayoría mononuclear, con formaciones ocasionales de agregados linfoides a partir del 3 día. Cambios regenerativos empezaron a distinguirse en el día 5 post-inyección pero menos prominente que en veneno y Mtx-1.

La inyección con la mezcla de las toxinas BaP1+Mtx-1 dio resultados similares a la inyección del veneno completo. Hubo mionecrosis coagulativa bien marcada durante los primeros 5 días que fue disminuyendo con el paso de los días, con hemorragia recientes hasta el día 5. El infiltrado inflamatorio consistió en polimorfonucleares en los 3 primeros días y luego con predominio de mononucleares en los días siguientes. Hubo algunos casos con formación de agregados linfoides a partir del día 7. Los cambios regenerativos empezaron a ser detectables a partir del día 5.

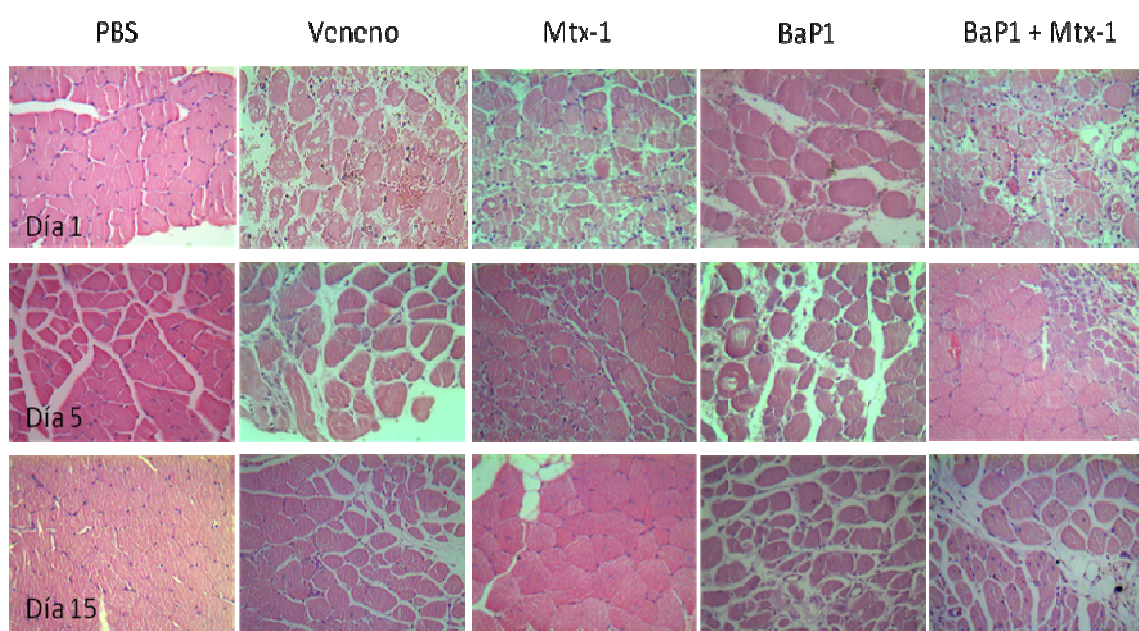


Figura 3. Micrografías de secciones de músculo gastrocnemio de ratón teñidos con hematoxilina-eosina a de los días 1, 5 y 15 post inyección con PBS, veneno, Mtx-1, BaP1 y BaP1 + Mtx-1. Aumento 40X. Fuente: Datos Experimentales.

El número de células contabilizadas para cada tipo celular fueron transformadas a un índice dado por la proporción entre el número de células de cada tipo y el número de células totales por campo. El tratamiento PBS se comportó como el control negativo que se esperaba con más del 99.7% de las células normales para los tres tiempos evaluados.

En la **Figura 4** se presenta un gráfico de cajas construido con los datos del recuento de células de cada tipo celular por campo evaluado durante todo el periodo de estudio para

cada tratamiento. Los resultados gráficos muestran los valores máximos y mínimos, la mediana de los valores más altos (cuartil 3), la mediana de todos los datos, y la mediana de los datos más bajos (cuartil 1). La mediana de las células normales fue de mayor a menor en los ratones tratados con BaP1, Mtx-1, veneno y BaP1 + Mtx-1. La mediana con valor más alto de células necróticas la presentaron los ratones tratados con veneno crudo, seguido por la mezcla de BaP1 + Mtx-1, BaP1 y por último Mtx-1. En cuanto la mediana de las células regenerativas, los ratones tratados con Mtx-1 muestra los valores más altos, seguido por orden descendente de veneno crudo, BaP1 + Mtx-1 y BaP1.

Se llevó a cabo análisis no paramétrico de Friedman y la prueba *post hoc* de esta, para probar si la proporción de cada tipo celular fue diferente entre los 5 tratamientos inyectados durante todo el tiempo de estudio y en cada punto de tiempo evaluado. Los resultados de la prueba de Friedman mostraron diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0.001$) para los tres tipos de células evaluadas (normales, necróticas y regenerativas).

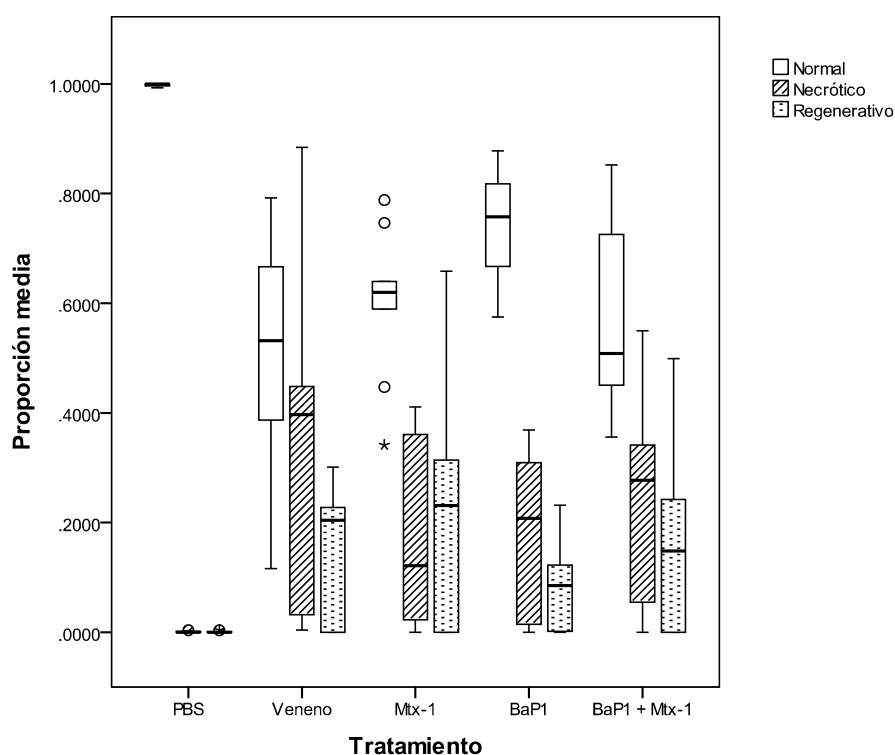


Figura 4. Diagrama de caja con las proporciones medias de cada tipo celular por tratamiento. • Valor atípico, * Valor extremadamente atípico. Fuente: datos experimentales.

La prueba *post hoc* mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la proporción de células normales encontradas en los ratones tratados con PBS y los demás tratamientos, a excepción de BaP1. Los ratones tratados con BaP1 a su vez, difirieron ($p < 0.05$) de aquellos tratados con veneno. En el análisis por punto de tiempo evaluado (días 1-15) (**Figura 5**) solo en el día 5 se presentaron resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$): los ratones tratados con veneno difirieron de los tratados con los demás tratamientos, a excepción de los ratones tratados con la mezcla BaP1+Mtx-1 ($p > 0.05$). A su vez los ratones tratados con BaP1+Mtx-1 difirieron significativamente de los ratones tratados con PBS.

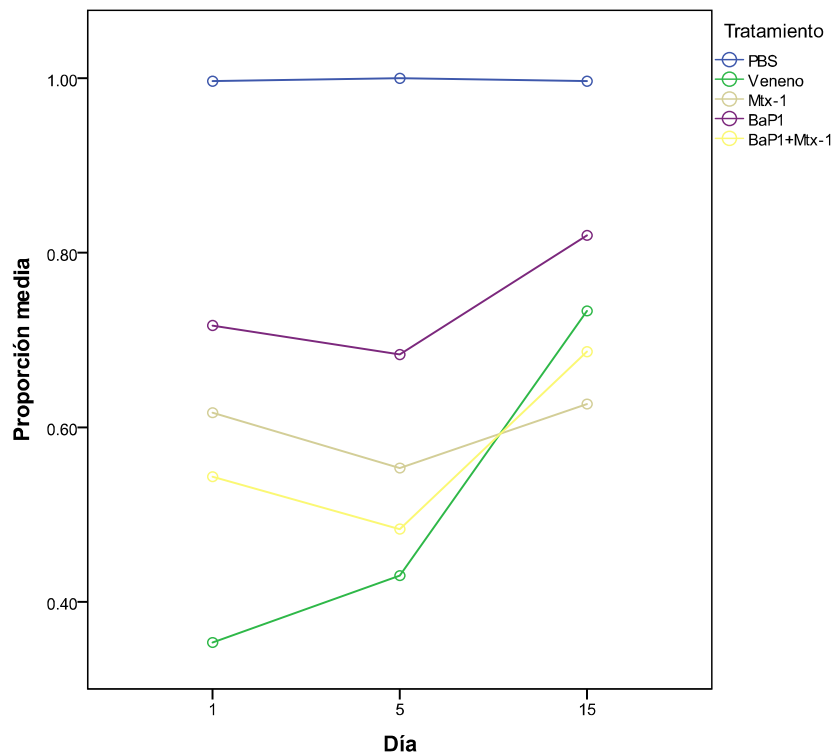


Figura 5. Proporción media de las células normales por tratamiento para cada tiempo post inyección. Fuente: datos experimentales.

La proporción de células necróticas fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) entre los ratones tratados con PBS y BaP1+Mtx-1 y entre los tratados con PBS y veneno. Al

analizar los resultados por día (**Figura 6**) no hubo diferencias entre tratamientos para ninguno de los 3 tiempos analizados.

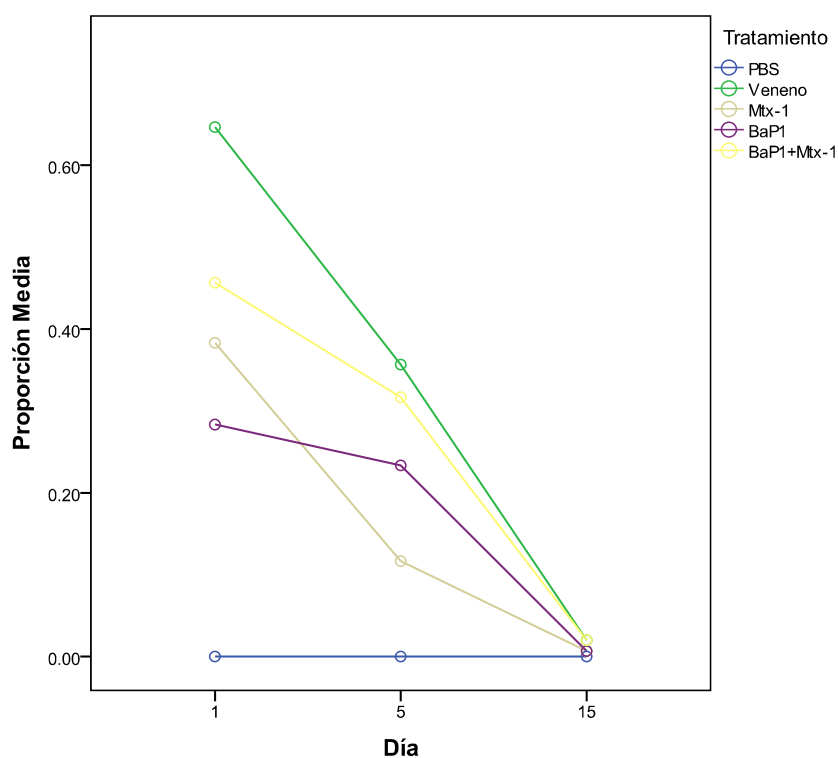


Figura 6. Proporción media de las células necróticas por tratamiento para cada tiempo post inyección. Fuente: datos experimentales.

Hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la proporción de células regenerativas únicamente entre los ratones tratados con PBS y Mtx-1. En el análisis por día (**Figura 7**), el día 5 fue el único que mostró variaciones significativas ($p < 0.05$) en los resultados: se encontró que solo los ratones tratados con Mtx-1 y con BaP1+Mtx-1 tuvieron una proporción de células regenerativas significativa con respecto a el control PBS; y que los ratones tratados con Mtx-1 también difirieron significativamente en su respuesta regenerativa en comparación con BaP1.

En conclusión los resultados indican que los tratamientos que causaron mayor daño al tejido muscular y con resultados similares son el veneno completo y la mezcla de las toxinas BaP1+Mtx-1. Los tratamientos con BaP1 y Mtx-1 por separado, a pesar de presentar células necróticas, estadísticamente no difirieron del tratamiento control PBS. Sin embargo, en términos de respuesta regenerativa el tratamiento con Mtx-1 fue el que obtuvo mejores resultados y el único con resultados estadísticamente significativos. Le siguieron en orden descendente de respuesta regenerativa BaP1+Mtx-1, veneno y por último BaP1.

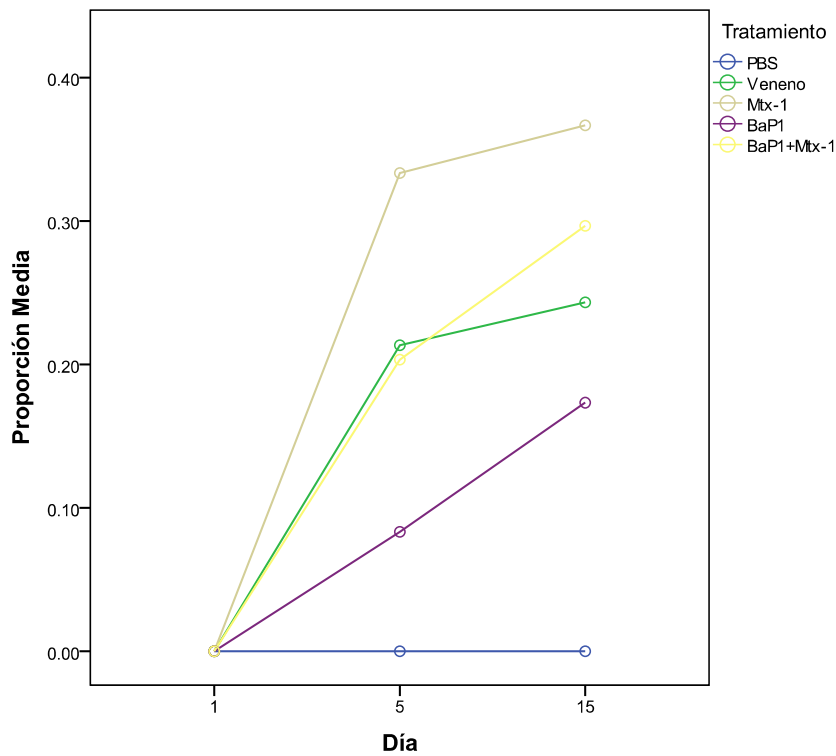


Figura 7. Proporción media de las células regenerativas por tratamiento para cada tiempo post inyección. Fuente: datos experimentales.

9. DISCUSIÓN

En el estudio histológico, aunque los resultados estadísticos no son concluyentes posiblemente debido al reducido número de réplicas, se marcó una tendencia en cuanto al daño generado por las toxinas y el grado de reparación muscular. La inyección del veneno crudo provocó el cuadro patológico esperado (**Gutiérrez *et al.*, 2009**) con abundante infiltrado inflamatorio, hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis, causando el mayor daño de todos los tratamientos puestos a prueba. Con la mezcla de BaP1 y Mtx-1 se logró un daño y recuperación muy similar al visto con el veneno crudo, demostrando como ya se ha visto en estudios anteriores que las metaloproteinasas del veneno y las fosfolipasas A2 son las principales toxinas causantes del cuadro patológico del envenenamiento por *B. asper* (**Gutiérrez *et al.*, 1995b**). La Mtx-1 provocó mionecrosis bien marcada en los primeros días, en general sin hemorragia, y con una mejor y más temprana respuesta regenerativa que el resto de tratamientos. La inyección con BaP1 indujo dermonecrosis, el rompimiento de vasos sanguíneos y mionecrosis, esta última más como una consecuencia secundaria de la falta de irrigación sanguínea. La regeneración con BaP1 fue la más baja de todos los tratamientos. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en otros estudios (**revisado en Gutiérrez *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2011**), en donde se ha visto una recuperación exitosa del músculo tras la inyección de PLA2 y homólogos de PLA2, en contraste con la recuperación parcial obtenida tras la inyección de metaloproteinasas del veneno de serpiente.

Al estudiar el patrón de expresión de la metaloproteína MMP-2 en los homogenizados de gastrocnemio se observó que tanto el veneno como la Mtx-1 mostraron la forma activada de esta proteína desde el primer día con valores superiores a los mostrados en el tratamiento con BaP1. Esto se debería a que el veneno completo induce la expresión y activación directa de la MMP-2 por un mecanismo en el cual las serino proteinasas del veneno juegan un papel importante; mientras que la BaP1 degrada la forma latente y activada de esta misma proteína (**Saravia-Otten *et al.*, 2004**). En el estudio de Zimoska *et al.* (**2008**) se concluyó que la activación de la MMP-2 es importante especialmente durante la fusión de los mioblastos (alrededor del día 7 al 14), pero que su activación desde los primeros días

también ayuda a degradar componentes de la MEC, evitando así una fibrosis. En la presente investigación, después de la reacción inflamatoria de la lesión, se observa que la MMP-2 en el grupo tratado con Mtx-1 alcanza el pico de activación (día 5) antes que con veneno o BaP1 (día 7), y que para el día 15 su actividad ha cesado en los músculos tratados con Mtx-1 pero no en los otros dos tratamientos modelos de mala regeneración. Así mismo se sabe que la degradación de la MEC por la MMP-2 (en acción conjunta con la MMP-9) estimula la angiogénesis (**Van Hinsbergh, Egelse & Quax, 2006**), y que en ratones tratados con BaP1 y veneno se da una revascularización exitosa pero tardía (**Hernández et al., 2011**). Esta información y los resultados obtenidos sugieren que la activación a destiempo de la MMP-2 puede estar relacionada con la revascularización tardía en los modelos de mala regeneración, lo que significa un déficit de oxígeno y nutrientes en momentos clave de la regeneración muscular.

La expresión de la proMMP-9 fue mayor durante los primeros 3 días post-inyección para todos los tratamientos y disminuyó gradualmente en los siguientes días coincidiendo con lo reportado por Kerif *et al.* (**1999**). Sin embargo, se observó que en el tratamiento con BaP1 los valores para cada punto de muestreo fueron siempre superiores a los observados para el tratamiento con Mtx-1. La diferencia entre tratamientos es aún más notoria en la expresión de la proteína activada MMP-9, la cual solo aparece en los ratones tratados con Mtx-1 con un patrón que coincide con la expresión y niveles de proMMP-9. En el estudio llevado a cabo por Lewis *et al.* (**2000**) se encontraron resultados consistentes con el concepto que el cambio en la matriz via MMP-9 puede estar involucrada en los eventos que llevan a la formación de miotubos, incluyendo la migración. Asimismo, en el estudio de Zimowska *et al.* (**2008**) se encontró evidencia de que la MMP-9 está involucrada en todas las etapas de la diferenciación de mioblastos. Más aún, se sabe que tanto la MMP-9 como la MMP-2 están involucradas en el proceso de angiogénesis y revascularización. La MMP-9 tiene un papel importante en la revascularización ya que no solo promueve la angiogénesis mediante la degradación de la matriz, también estimula el reclutamiento y acción de las células accesorias derivadas de sangre o médula ósea que favorecen la angiogénesis y su deficiencia en ratones causa un retraso en la misma (**Van Hinsbergh, Egelse & Quax, 2006**). Además, la acción de la MMP-9 está involucrada en la

estabilización de los vasos recién formados a través del reclutamiento de pericitos (**Chantrain et al., 2004**). Por lo tanto se especula que en los tratamientos donde no se da una activación de la MMP-9 (veneno y BaP1), que además es en los que se da una destrucción de vasos sanguíneos, también se está impidiendo una correcta revascularización tras el envenenamiento, lo que a su vez estaría limitando una correcta regeneración muscular.

La regulación de la actividad enzimática de la MMP-9 se puede dar en su síntesis, en la activación del zimógeno y por inhibición de su forma activada, principalmente por enzimas de tejido inhibitoras de metaloproteínasas (TIMP) (**Carmeli et al., 2004; van Hinsbergh, Engelse & Quax, 2006**). Como parte de la reacción inflamatoria llegaron al sitio de la lesión neutrófilos y macrófagos, que se sabe secretan proMMP-9 (**Schoser et al., 2002; Gioia et al., 2009**). Ya que la síntesis de la proMMP-9 no parece ser la razón de la diferencia entre tratamientos, la regulación de la activación de la proMMP-9 es la que se está viendo afectada en los tratamientos con veneno y BaP1. La activación de la proMMP-9 puede llevarse a cabo con la ayuda de otras MMP; se sabe que los activadores naturales son la MMP-2 activada a través de la MT1-MMP (**Toth et al., 2003**) y la MMP-3 activada por plasmina (**Ramos-Desimone et al., 1999**). Ya sea una o la otra, un fino balance entre estas MMP y las TIMP-1 y TIMP-2 ejercen un control sobre la activación de la MMP-9 (**Ramos-Desimone et al., 1999; Lewis et al., 2000; Toth et al., 2003**). La no activación de la proMMP-9 puede deberse a tres posibilidades a) altos niveles de sus inactivadores (las TIMP), b) baja concentración de sus activadores o c) la inhabilidad de la proMMP-9 de interactuar con sus potenciales activadores en la superficie de la membrana plasmática. La explicación del por qué no se da la activación de la proMMP-9 en los tratamientos con veneno y BaP1 a pesar de la existencia de MMP-2 activada en el medio no queda clara en este estudio, pero los resultados obtenidos parecen indicar que el daño causado a los capilares y la consecuente insuficiente irrigación sanguínea está impidiendo un adecuado balance de activadores e inhibidores.

Se conjetura que la pobre regeneración observada tras el envenenamiento con *B. asper* es debido mayormente al daño a la microvasculatura y a nervios intramusculares (**Arce,**

Brenes & Gutiérrez, 1991; Gutiérrez & Ownby, 2003). No obstante, las diferencias en el patrón de expresión de la MMP-2 y de la actividad de la MMP-9 encontradas en los diferentes tratamientos pueden estar implicadas al menos en la recuperación diferencial de la microvasculatura según el tratamiento. Este hallazgo refleja la necesidad de seguir profundizando en el esclarecimiento de la expresión y activación oportuna de las gelatinasas y el adecuado balance con sus inhibidores para que se dé una correcta sincronía entre los eventos de revascularización y regeneración muscular tras el envenenamiento. Este conocimiento permitirá desarrollar tratamientos apropiados para el envenenamiento ofídico y otro tipo de lesiones similares.

10. CONCLUSIONES

- Se observó una tendencia a la recuperación distinta según el tratamiento aplicado, ya que los músculos de ratones inyectados con veneno y BaP1 mostraron un mayor porcentaje de células necróticas y menores índices de regeneración que los encontrados en los ratones inyectados con Mtx-1.
- La inyección de veneno crudo o de la metaloproteinasa hemorrágica BaP1 en el gastrocnemio de ratón, ambos descritos como modelos de mala regeneración muscular, inducen un patrón de activación a destiempo de la gelatinasa MMP-2 en el músculo de ratón durante el proceso de regeneración muscular.
- Aunque la forma inmadura de MMP-9 se detectó durante la fase inflamatoria en los tres tratamientos estudiados, la forma activa de esta gelatinasa se expresa únicamente en músculos de ratón inyectados con la miotoxina Mtx-1, que es un modelo de buena regeneración.

11. RECOMENDACIONES

- Estudiar la transcripción y traducción de la metaloproteínasa de matriz MMP-9, así como el balance de esta gelatinasa con sus activadores e inhibidores, durante el período crítico de regeneración muscular en los modelos de mala y buena regeneración muscular en ratón.
- Investigar la expresión y activación de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, en conjunto con la metaloproteínasa ligada a membrana MT1-MMP, en relación con el proceso de revascularización en los modelos de regeneración muscular en ratón.
- Esclarecer las causas de la activación a destiempo de la MMP-2 en los modelos de mala regeneración a través del estudio de sus activadores naturales e inhibidores, y el balance entre estos.
- Evaluar la utilidad terapéutica de utilizar inhibidores de las metaloproteínas del veneno como medida complementaria al tratamiento del accidente ofídico.

12. REFERENCIAS

1. Alape-Girón A. *et al.* Snake Venomics of Lancehead Pitviper *Bothrops asper*; Geographic, Individual and Ontogenetic Variations. *J Prot Res* 2008;7:3556-3571.
2. Angulo Y., Lomonte B. Biochemistry and Toxicology of Toxins Purified from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 2009;54:949-957.
3. Aragón-Ortiz F., Gubensek F. Characterization of a Metallo-proteinase from *Bothrops asper* (Terciopelo) Snake Venom. *Toxicon* 1987;25:759-766.
4. Arce, V., Brenes, F., Gutiérrez, J.M. Degenerative and Regenerative Changes in Murine Skeletal Muscle after Injection of Venom from the Snake *Bothrops asper*: a Histochemical and Immunocytochemical Study. *Int J Exp Pathol* 1991;72:211–226.
5. Armstrong DG., Jude EB. The Role of Matrix Metalloproteinases in Wound Healing. *J Am Podiatr Med Assoc* 2002;92(1):12-18.
6. Badilla B., Chaves F., Mora G., Poveda LJ. Edema Induced by *Bothrops asper* (Squamata:Viperidae) Snake Venom and its Inhibition by Costa Rican Plants Extracts. *Rev Biol Trop* 2006;54(2):245-252.
7. Borkow G., Gutiérrez JM., Ovadia M. Isolation and Characterization of Synergistic Hemorrhagins from the Venom of Snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 1993;31:1137-1150.
8. Borrantes A., Solis V., Bolaños R. Alterations in Coagulation Mechanisms of Patients Bitten by *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* 1985;23:399-407.
9. Campbell JA. Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, the Yucatán, and Belize. EEUU: University of Oklahoma Press, 1999. p. 274-277.
10. Campbell JA., Lamar WW. The venomous reptiles of Latin America. EEUU: Cornell University Press, 1989. p. 189-192.

11. Carmeli E. *et al.* Matrix Metalloproteinases and Skeletal Muscle; A Brief Review. *Muscle Nerve* 2004;191-197.
12. Castrillón-Estrada DF., Acosta Vélez JG., Hernández-Ruiz EA., Alonso Palacio LM. Envenenamiento Ofídico. *Salud Uninorte* 2007;23(1):96-111.
13. Chantrain CF, *et al.* Stromal Matrix Metalloproteinase-9 Regulates the Vascular Architecture in Neuroblastoma by Promoting Pericyte Recruitment. *Cancer Res* 2004;64:1675-1686.
14. Chargé BP., Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-238.
15. Chaves F., Barboza M., Gutiérrez JM. Pharmacological Study of Edema Induced by Venom of snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in Mice. *Toxicon* 1995;33:31-39.
16. Chaves F. Gutiérrez JM., Brenes F. Pathological and Biochemical Changes Induced in Mice After Intramuscular Injection of Venom from Newborn Specimens of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* 1992;30:1099-1109.
17. Cisneros-Heredia DF., Touzet J-M. Distribution and Conservation Status of *Bothrops asper* (Garman, 1884) in Ecuador. *Herpetozoa* 2004;17(3/4):135-141.
18. Díaz-Oreiro C., Gutiérrez JM. Chemical Modification of Histidine and Lysine Residues of Myotoxic Phospholipases A₂ Isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* Snake Venoms; Effects on Enzymatic and Pharmacological Properties. *Toxicon* 1997;35:241-252.
19. Franceschi A. *et al.* Purification and Characterization of BaH4, a Hemorrhagic Metalloproteinase from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 2000; 38:63-77.
20. Gioia M. *et al.* The Collagen Binding Domain of Gelatinase A Modulates Degradation of Collagen IV by Gelatinase B. *J Mol Biol* 2009;386:419-434.

21. Gutiérrez JM. Chapter 30; Clinical toxicology of snakebite in Central America. p 645-665. (In Meier, J., White, J. Handbook of clinical toxicology of animal venoms. Florida: CRC, 1995.)
22. Gutiérrez J.M. Comprendiendo los Venenos de Serpientes; 50 años de Investigaciones en América Latina. Rev Biol Trop 2002;50(2):377-394.
23. Gutiérrez JM, Chaves F., Bolaños R. Estudio Comparativo de Venenos de Ejemplares Recién Nacidos y Adultos de *Bothrops asper*. Rev Biol Trop 1980;28:341-351.
24. Gutiérrez JM. *et al*^a. Isolation and Characterization of a Metalloproteinase with Weak Hemorrhagic Activity from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo). Toxicon 1995;33(1):19-29.
25. Gutiérrez, J.M *et al*^b. Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, a Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (terciopelo). Exp Mol Pathol 1995;62:28-41.
26. Gutiérrez J.M., Lomonte B. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms. Toxicon 1995;33(11):1405-1424.
27. Gutiérrez JM., Lomonte, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. p 310-323. (En Cardoso, JLC. *et al*. Animais Peconhentos no Brasil; Biología, Clínica e Terapêutica dos Accidentes. Sao Paulo, 2003.)
28. Gutiérrez J.M., Ownby C.L. Skeletal Muscle Degeneration Induced by Venom Phospholipases A₂: Insights into the Mechanisms of Local and Systemic Myotoxicity. Toxicon 2003;42:915-931.
29. Gutiérrez JM., Rojas G., Aymerich R. El Envenenamiento por Mordedura de Serpiente en Centroamérica. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado, 2005. 29pp.
30. Gutiérrez JM. *et al*. Experimental Pathology of Local Tissue Damage Induced by *Bothrops asper* Snake Venom. Toxicon 2009; 54: 958-975.

31. Hernández R. *et al.* Poor Regenerative Outcome after Skeletal Muscle Necrosis Induced by *Bothrops asper* Venom: Alterations in Microvasculature and Nerves. PLoS One 2011; 6(5): e19834
32. Holmbeck K. *et al.* MT1-MMP Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease Due to Inadequate Collagen Turnover. Cell 1999;99(1):81-92.
33. Instituto Bioclón. Bases para el Tratamiento en la Intoxicación Causada por Mordedura de Serpientes y Picadura de Alacrán. México: Instituto Bioclón, 1997. p1-20.
34. Itoh Y., Seiki M. MT1-MMP; An Enzyme with Multidimensional Regulation. Trends Biochem Sci 2004; 29(6):285-289.
35. Johnson LL., Dyer R., Hupe DJ. Matrix Metalloproteinases. Curr Opin Chem Biol 1998;2(4):466-471
36. Karp G. Biología Celular y Molecular; Conceptos y Experimentos. 4 ed, México: McGraw-Hill Interamericana, 2006. 899pp.
37. Kherif S. *et al.* Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Regenerating Skeletal Muscle; A Study in Experimentally Injured and *mdx* Muscles. Dev Biol 1999;205:158-170.
38. Kiran MS., Kumar S., Viji RI., Sudhakaran PR. Temporal Relationship between MMP production and angiogenic process in HUVECs. Cell Biol Int 2006; 30:704-713.
39. Kössi J. *et al.* Overview of Wound Healing. Ann Chir Gynaecol 2001;90(215):15-18.
40. Lewin B., Lingappa VR., Cassimeris L., Plopper G. Cells. EEUU: Jones & Bartlett Publishers, 2006. 863pp.
41. Lewis MP, Tippet H *et al.*. Gelatinase-B (Matix Metalloproteinase-9, MMP-9) Secretion is Involved in the Migratory Phase of Human and Murine Muscle Cultures. J Muscl Res Cell Motil 2000; 21:223-233.

42. Li H. *et al.* Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition Ameliorates Pathogenesis and Improves Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009;18(14):2584-2598.
43. Lodish H. *et al.* *Molecular Cell Biology*. 5ed. EEUU: W. H. Freeman Company, 2003. 973p.
44. Meier J., Stocker K. Chapter 24; Biology and Distribution of Venomous Snakes of Medical Importance and the Composition of Snake Venoms. p 368-391. (In Meier, J., White, J. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms*. Florida: CRC, 1995.)
45. Montaner Villalonga J. *El Papel de las Metaloproteinasas de Matriz en la Fase Aguda del Ictus Isquémico*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis doctoral, Facultad de Medicina) 2001. 118p.
46. Muhs BE. *et al.* Temporal Expression and Activation of Matrix Metalloproteinases-2, -9 and Membrane Type 1- Matrix Metalloproteinase Following Acute Hindlimb Ischemia. *J Surg Res* 2003;111:8-15.
47. Murphy G., Nagase H. Progress in Matrix Metalloproteinase Research. *Mol Aspects Med* 2008;29:290-308.
48. Musaro A. *et al* Cellular and Molecular Bases of Muscle Regeneration; The Critical Role of Insuline-Like Growth Factor 1. *Int Cong Ser* 2007;13032:89-100.
49. Nagase H., Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-21494.
50. Nguyen M., Arkell J., Jackson CJ. Thrombin Rapidly and Efficiently Activates Gelatinase A in Human Microvascular Endothelial Cells Via a Mechanism Independent of Active MT1 Matrix Metalloproteinase. *Lab Invest* 1999;79(4):467-475.
51. Nguyen M., Arkell J., Jackson CJ. Activated Protein C Directly Activates Human Endothelial Gelatinase A. *J Biol Chem* 2000;275(13):9095-9098.

52. Nguyen M., Arkell J., Jackson CJ. Human Endothelial Gelatinases and Angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:960-970.
53. Ohtake Y., Tojo H., Seiki M. Multifunctional roles of MT1-MMP in Myofiber Formation and Morphostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *J Cell Sci* 2006;119:3822-3832.
54. Pekovich SR., Bock PE., Hoover RL. Thrombin-thrombomodulin Activation of Protein C Facilitates the Activation of Progelatinase A. *FEBS letters* 2001;494:129-132.
55. Ramos-DeSimone N *et al.* Activation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) via Converging Plasmin/Stromelysin-1 Cascade Enhances Tumor Cell Invasion. *J Biol Chem* 1999;274(19):13066-13076.
56. Roach DM. *et al.* Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 Leads to Degradation of Type IV Collagen During Skeletal Muscle Reperfusion Injury; Protection by the MMP Inhibitor, Doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:260-269.
57. Ruangpanit ND. *et al.* Gelatinase A (MMP-2) Activation by Skin Fibroblasts; Dependence on MT1-MMP Expression and Fibrillar Collagen Form. *Matrix Biol* 2001;20:193-203.
58. Rucavado A, *et al.* Local Tissue Damage Induced by BaP1, a Metalloproteinase Isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) Snake Venom. *Exp Mol Pathol* 1995;63:186-199.
59. Rucavado A., Nuñez, J., Gutiérrez, JM. Blister Formation and Skin Damage Induced by BaP1, a Hemorrhagic Metalloproteinase from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. *Int J Exp Path* 1998;79:245-254.
60. Rucavado A. *et al.* Increments in Cytokines and Matrix Metalloproteinases in Skeletal Muscle After Injection of Tissue-damaging Toxins from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. *Med Infl* 2002;11:121-128.

61. Rucavado A. *et al.* Thrombocytopenia and Platelet Hypoaggregation Induced by *Bothrops asper* Snake Venom; Toxins Involved and Their Contribution to Metalloproteinase-induced Pulmonary Hemorrhage. *Thromb Haemost* 2005;94:123-131.
62. Saravia-Otten, P. *et al.* Membrane Independent Activation of Fibroblast ProMMP-2 by Snake Venom; Novel Roles for Venom Proteinases. *Toxicon* 2004;44:749-764.
63. Schoser, B.G, Blottner, D. & Stuerenburg, H.J. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. *Acta Neurol Scand* 2002;105: 309-13.
64. Seiki M. Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase; A Key Enzyme for Tumor Invasion. *Cancer Lett* 2003; 194:1-11.
65. Shamamian P. *et al.* Activation of Progelatinase A (MMP-2) by Neutrophil Elastase, Cathepsin G, and Proteinase-3; A Role for inflammatory Cells in Tumor Invasion and Angiogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 189-206.
66. Siegel, S. & Castellan NJ. Jr. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Science*. 2nd ed. EEUU: Mcraw-Hill, 1988, XXI + 401 pp.
67. Soo, C. *et al.* Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and their Tissue-Derived Inhibitors in Cutaneous Wound Repair. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:638-647.
68. Souni NE. *et al.* MT1-MMP Expression Promotes Tumor Growth and Angiogenesis Through an Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *FASEB J* 2002; 16:555-564.
69. Trengove NJ. *et al.* Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg* 1999;7:442-452.
70. Toth M. *et al.* Pro-MMP-9 Activation by MT1-MMP/MMP-2 Axis and MMP-3; Role of TIMP-2 and Plasma Membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:386-395.

71. Uitto V-J., Larjava H. Extracellular Matrix Molecules and Their Receptors; an Overview with Especial Emphasis on Periodontal Tissues. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2(2):323-354.
72. Van Hinsbergh VWM., Engelse MA., Quax PHA. Pericellular Proteases in Angiogenesis and Vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:716-728.
73. Vu TH. *et al.* MMP-9/Gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes. *Cell* 1998;93:411-422.
74. White J. Snake Venoms and Coagulopathy. *Toxicon* 2005;45:951-967
75. Wu, W.-B. & Huang, T.-F. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. *Exp Cell Res* 2003; 288:143-157.
76. Zhou Z. *et al.* Impaired Endochondral Ossification and Angiogenesis in Mice Deficient in Membrane-Type Matrix Metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(8):4052-4057.
77. Zimowska, M. *et al.* Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Int J Dev Biol* 2008;52:307-314.
78. Zucker S. *et al.* Thrombin Induces the Activation of Progelatinase A in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* 1995;270(40):23730-23738.

13. ANEXOS

ANEXO 1

FOTOGRAFÍA DE *Bothrops asper* (Garman, 1984)



Fig. 1. *Bothrops asper* (Garman,1884). (Fotografías tomadas por: izquierda, A. Coritz; derecha W. Wuster)

ANEXO 2

MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE *Bothrops asper* (Garman, 1984)

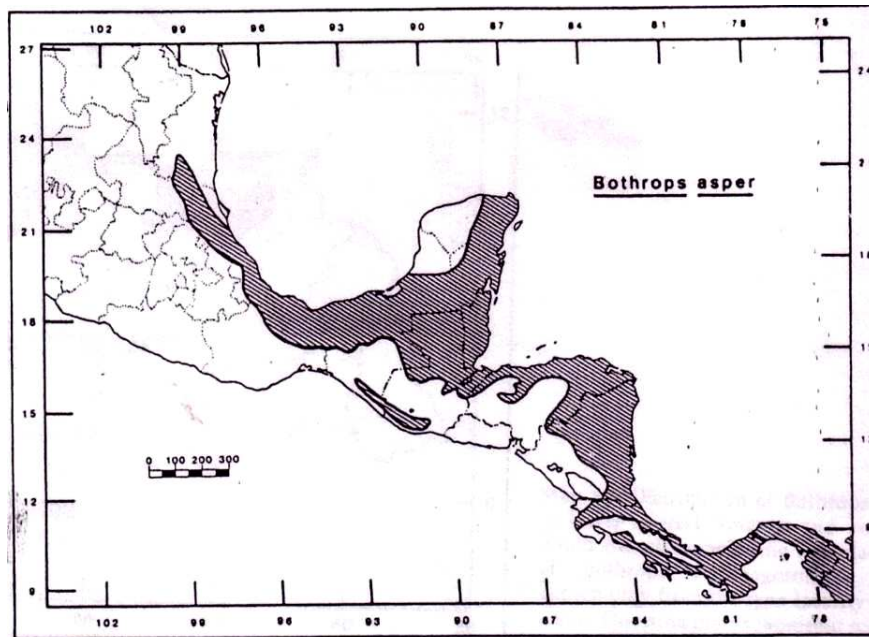


Fig. 2. Mapa de distribución Mesoamericana de *Bothrops asper* (Garman, 1984). Fuente: Campell *et al.*, 1989.

ANEXO 3

CLASIFICACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Tabla 1. Clasificación de las metaloproteinasas de matriz presentes en humanos y sus sustratos

| Clasificación | Enzima | Ejemplos de sustrato |
|--------------------------|-------------------------------|--|
| Colagenasas | Colagenasa -1 (MMP-1) | • Colágeno I, II, III, VII, VIII, X |
| | Colagenasa-2 (MMP-8) | • Colágeno I, II, III |
| | Colagenasa-3 (MMP-13) | • Agrecan, colágeno I, II, III, IV, IX, XIV, fibronectina, gelatina, laminina |
| Gelatinasas | Gelatinasa A (72 kDa) (MMP-2) | • Colágeno I, IV, V, VII, X, gelatina, fibronectina |
| | Gelatinasa B (92 kDa) (MMP-9) | • Colágeno IV, V, VII, XI, XIV, elastina, gelatina |
| MMP de membrana | MT1-MMP (MMP-14) | • Agrecan, colágeno I, II, III, gelatina, entactina, fibrina, laminina, perlecan, vitronectina |
| | MT2-MMP (MMP-15) | • Agrecan, entactina, fibronectina, laminina, perlecan |
| | MT3-MMP (MMP-16) | • Cartilago, colágeno III, fibronectina, gelatina, laminina |
| | MT4-MMP (MMP-17) | • Gelatina |
| | MT5-MMP (MMP-24) | • Aun no determinado |
| | MT6-MMP (MMP-25) | • Aun no determinado |
| Estromelisinias | Estromelisinina-1 (MMP-3) | • Agrecan, colágeno IV, V, IX, X, elastina, entactina, fibronectina, gelatina, laminina |
| | Estromelisinina-2 (MMP-10) | • Igual que MMP-3 |
| MMP tipo estromelisinina | Estromelisinina-3 (MMP-11) | • Serpinas |
| | Matrilisina (MMP-7) | • Colágeno IV, elastina, entactina, fibronectina, laminina |
| | Metaloelastasa (MMP-12) | • Colágeno IV, elastina, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina |
| Otras MMP | MMP-19 | • Gelatina |
| | Enamelisina (MMP-20) | • Amelogenina |
| | MMP-23 | • Sustrato sintético de MMP |
| | MMP-26 | • Gelatina, sustrato sintético de MMP |

Fuente: Basado en Lewin *et al.*, 2006.