

## Relaciones entre capilares, fibras musculares esqueléticas y células satélites durante la regeneración

Relations among capillaries, skeletal muscle fibers and satellite cells during regeneration

Ignacio Ruz Caracuel, Fernando Leiva Cepas, Evelio Luque Carabot, Ignacio Jimena Medina y José Peña Amaro

*Departamento de Ciencias Morfológicas. Sección de Histología. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba. España*

### Resumen

**Introducción:** En este estudio se analizan las modificaciones en las relaciones topográficas de los capilares con las fibras musculares y células satélites durante la fase de remodelación de la regeneración muscular.

**Material y métodos:** Los músculos tibial anterior de ratas Wistar, lesionados por inyección intramuscular de mitotóxico, fueron analizados a los 5, 7 y 20 días postlesión en microscopía de luz y electrónica. En cortes semifinos teñidos con azul de toluidina fueron analizadas la densidad capilar, densidad de fibras e índice capilar/fibra; sobre micrografías electrónicas se analizaron las distancias de difusión entre capilares-fibras musculares regenerativas y capilares-células satélites, así como el número de células satélites junto a un capilar.

**Resultados:** A los 5 días postlesión la densidad capilar y la densidad de fibras se encontraron significativamente incrementadas así como las distancias de difusión entre los capilares con las fibras regenerativas y células satélites; además sólo un 47% de las células satélites se situaban junto a un capilar. A partir del día 7 postlesión todos los parámetros se aproximaron a los valores controles, normalizándose a los 20 días postlesión.

**Conclusión:** Estos hallazgos indican que al inicio de la fase de remodelación la mayor densidad capilar no parece estar ligada a mayores necesidades de oxigenación de las fibras musculares regenerativas y células satélites. Estos resultados están en buena relación con recientes estudios que señalan que bajas concentraciones de oxígeno favorecen la miogénesis.

### Abstract

**Introduction:** This study analyzes the modifications in topographic relations among capillaries, skeletal muscle fibers and satellite cells during the remodeling phase of muscle regeneration.

**Material and methods:** Tibial anterior muscles of Wistar rats were injured by intramuscular myotoxic injection and analyzed 5, 7 and 20 days postlesion under light and electron microscopy. Capillary density, fiber density, and capillary/fiber index were analyzed in toluidine blue semithin sections; diffusion distances between capillaries-regenerative muscle fibers and capillaries-satellite cells, as well as the number of satellite cells beside a capillary, were analyzed on electron micrographics.

**Results:** At day 5 postlesion capillary density and fiber density DF are significantly increased as well as diffusion distances of capillaries in relation to regenerative fibers and satellite cells; moreover only the 47% of satellite cells are beside a capillary. From day 7 postlesion, all the parameters approach normal values, becoming normal at day 20 postlesion.

**Conclusion:** These findings show that high capillary density at the beginning of the remodeling phase is not related to an increase in the oxygenation requirement of regenerative muscle fibers and satellite cells. These results are in good relation with recent studies that point out that low oxygen concentrations contribute to myogenesis.

*Palabras clave: Músculo esquelético, regeneración muscular, células satélites, capilares musculares.*

*Keywords: Skeletal muscle, muscle regeneration, satellite cells, muscle capillaries.*

## INTRODUCCIÓN

Los dos tipos celulares que constituyen el tejido muscular esquelético, la fibra muscular esquelética y la célula satélite, mantienen una estrecha relación con la microvascularización. Por un lado, el abastecimiento capilar del músculo, que permite el intercambio de gases respiratorios, suministro de nutrientes y metabolitos con las fibras musculares (1) se ve afectado tanto por el tamaño como por la proporción de tipos de fibras musculares (2). De otro lado, los capilares mantienen también una estrecha relación con las células satélites tanto por mantener una correlación positiva en su número como por su colocalización, ya que en un músculo normal un 88% de éstas presenta un capilar en su vecindad (3); además, en condiciones de normalidad, esta población celular se encuentra localizada entre la membrana plasmática y la lámina basal de la fibra muscular, con lo que se establece un microambiente bien definido histológicamente conocido como nicho capilar- célula satélite (4,5).

En la lesión tiene lugar una severa destrucción de la histoarquitectura muscular que, sin embargo, es seguida de una completa regeneración. Se trata de un complejo proceso espacio-temporal de acontecimientos moleculares, celulares y tisulares coordinados por los efectos de factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular, interacciones célula-célula y célula-matriz (6). En este proceso se distinguen las fases de degeneración o destrucción, regeneración o reparación y remodelación (7). Básicamente, la fase degenerativa incluye la destrucción del área afectada y la respuesta inflamatoria; tras ésta, la fase de regeneración se caracteriza por la activación, proliferación y diferenciación de las células satélites, y su fusión en miotubos o fibras musculares regenerativas. En la fase de remodelación, y simultáneamente con el crecimiento y maduración de fibras musculares regenerativas hacia miofibras adultas, otros elementos tisulares como la matriz extracelular, red vascular y nervios sufren notables modificaciones cuyo papel es esencial para garantizar la recuperación morfológica y funcional del músculo (8).

La revascularización del área lesionada se ha relacionado con las mayores necesidades de oxigenación y nutrientes, necesarias en la intensa fase metabólica de la regeneración (9, 10). En concreto, se sabe que la fase de remodelación se acompaña de un aumento de la capilarización, gobernado por los cambios en el tamaño de las fibras musculares, que se normaliza gradualmente al final del proceso regenerativo (11,12). De acuerdo a la etapa de maduración de las fibras musculares regenerativas, las células satélites que se asocian a ellas también varían en número, características morfológicas y morfométricas (13).

Si bien se ha señalado que la miogénesis y la angiogénesis son acontecimientos coordinados durante la regeneración (14), no queda claro si las modificaciones cuantitativas que ocurren en la red capilar, fibras musculares y células satélites pueden afectar también a sus relaciones topográficas. En nuestra opinión este aspecto es importante ya que determinaría el comportamiento funcional de estos elementos en la coordinación de la angiogénesis y miogénesis regenerativa.

En este sentido, el presente estudio examina, en tres etapas evolutivas de la fase de remodelación, las modificaciones en las relaciones topográficas de los capilares con las fibras musculares regenerativas y con las células satélites que las acompañan. Por lo que respecta a la fibra muscular en regeneración, analizamos las distancias de difusión, un parámetro de gran importancia para determinar la oxigenación de un tejido (15, 16, 17). Por otro lado, aunque se ha referido que probablemente la razón de la posición yuxtavascular de las células satélites durante la regeneración esté en relación con la influencia reguladora mediante la secreción de factores solubles que interaccionan entre ambos elementos (5), no existen datos estructurales de la relación entre capilares y células satélites durante este proceso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales:

Ratas Wistar adultas de un peso aproximado de 210 g recibieron, bajo anestesia, una inyección intramuscular de mepiva-

caina al 2% en los músculos tibial anterior para inducir la degeneración y posterior regeneración de las fibras musculares. Los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia (75 mg/Kg de ketamina y 0.5 mg/Kg de medetomidina), en grupos de seis ratas cada uno, a los 5, 7 y 20 días tras la lesión; seis ratas normales fueron empleadas como controles. Todos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-23°C), iluminación (ciclos controlados de 12 h luz-12 h de oscuridad) y con suministro de comida (Purina, Barcelona, España) y agua ad libitum. El protocolo de cuidado y condiciones experimentales de los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba (España).

### Procesamiento de muestras y técnicas de estudio:

Tras el sacrificio los músculos tibial anterior fueron diseccionados y del vientre muscular se tomaron muestras que fueron troceadas en pequeños fragmentos, fijadas en glutaraldehído al 2.5% durante 48 horas a 4°C y refijadas en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente fueron deshidratadas en acetonas de graduación creciente e incluidas en araldita. En un ultramicrotomo se obtuvieron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de toluidina para su análisis en microscopía de luz y cortes ultrafinos, contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo, para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10 (Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación SCAI. UCO).

### Estudio cuantitativo:

Empleando cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, seleccionamos aquellos bloques (10 por cada período regenerativo y grupo control) que contenían áreas homogéneas de fibras musculares cortadas transversalmente. Puesto que con esta tinción fue evidente la distinción de tipos de fibras en los músculos normales y a los 20 días postlesión (pero no a los 5 y 7) el estudio cuantitativo se realizó teniendo en cuenta la existencia de fibras tipo I y II. Las imágenes fueron capturadas y digitalizadas, a unos aumentos de x400, con una cámara Sony Exwaved HAD montada en un microscopio Nikon Eclipse E1000. El estudio cuantitativo-morfométrico se realizó empleando el programa de análisis de imagen Imago-Pro Plus (Media Cybernetics, Version 6, 2006).

Sobre los cortes seleccionados analizamos la densidad de fibras (DF:número de fibras/área), la densidad capilar (DC: número de capilares/área); a partir de estos parámetros fue calculada la proporción capilar/fibra (índice C/F). En las mismas áreas fue medida el área ocupada por intersticio que fue expresada como porcentaje de la región analizada. Estas mediciones se realizaron en dos áreas de cada sección semifina bloque, cubriendo en conjunto un área total de 94500  $\mu\text{m}^2$ .

### Distancias de difusión entre capilares y fibras musculares:

A unos aumentos de x1000 se estimó la distancia de difusión utilizando un esquema de círculos concéntricos superpuestos sobre la fibra muscular. Desde 20 puntos tomados al azar del interior de cada fibra se midió la distancia al capilar más cercano a cada uno de ellos (18, 19). Este procedimiento se repitió para un total de 20 fibras, tomadas al azar, de cada tiempo postlesión (5, 7 y 20 días) y fibras normales. Los resultados obtenidos se presentaron como una distribución de frecuencias acumulativas de forma individualizada para cada estadio regenerativo y fibras musculares normales. De los valores obtenidos fueron calculados el percentil 50 (R50) y el percentil 95 (R95) como distancias de difusión media y máxima respectivamente.

### Distancias de difusión entre capilares y células satélites:

En microscopía electrónica de transmisión fueron cuantificadas las células satélites que presentaban un capilar en su vecindad (3), fotografiadas a unos aumentos de 6000x y transferidas a un ordenador. Sobre las micrografías electrónicas se estimó la distancia de difusión desde 20 puntos de la célula satélite, tomados al azar y siguiendo el esquema de círculos concéntricos, al capilar más cercano a ella. Este procedimiento se repitió para un total de 20 células satélites en cada tiempo postlesión y de músculos controles. Las distancias fueron agrupadas en tres tramos (<5 $\mu\text{m}$ , 5-10 $\mu\text{m}$ , >10 $\mu\text{m}$ ) según lo descrito por Christov et al (3).

**Análisis estadístico:**

Los resultados se expresaron como medias ± SD. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, seguido por la comparación múltiple usando el test Newman-Keuls. El nivel de significancia fue  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS**

**Evaluación histológica en cortes semifinos:**

En los músculos controles (fig.1a) las fibras musculares tenían una morfología poligonal con mionúcleos periféricos; los capilares, dispuestos en el endomisio, se situaban muy próximos a las fibras musculares.

A los 5 días tras la lesión (fig.1b) las fibras regenerativas mostraban núcleos pálidos con evidente nucleolo y un citoplasma ocupado por miofibrillas separadas entre sí; el espacio intersticial estaba aumentado y los capilares, claramente evidentes, se disponían alrededor de las fibras aunque notablemente alejados de ellas.

A los 7 días postlesión (fig.1c) las fibras musculares regenerativas mostraban contornos redondeados, núcleos grandes pálidos con evidente nucleolo y su citoplasma, aunque ocupado por miofibrillas aún separadas, tenía un anillo periférico carente de ellas. El intersticio estaba aún aumentado y en su seno se apreciaban capilares y gran celularidad intersticial.

A los 20 días postlesión (fig.1d) era evidente la diferencia en tipos de fibras (I y II) mostrando como rasgo diferencial la presencia de núcleos internos; en el reducido espacio endomisial se observaban los capilares rodeando a las fibras y muy escasa celularidad.

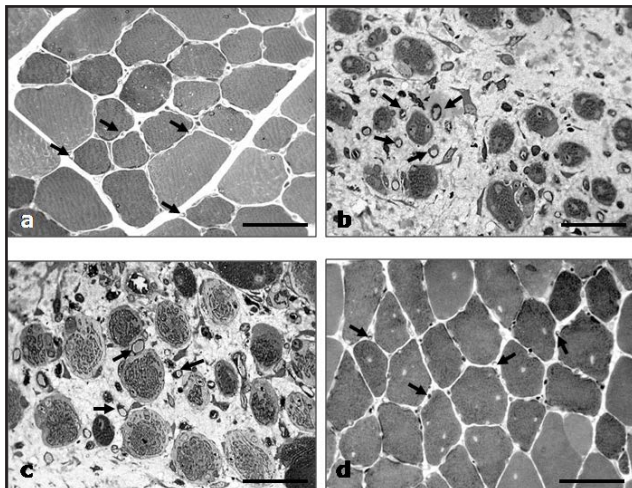


Figura 1. Secciones transversales correspondientes a músculos control (a), 5 días (b), 7 (c) y 20 días postlesión (d). Obsérvese la disposición y distancia entre las fibras musculares normales y los capilares (flechas). Azul de toluidina, x400. Barra de calibración = 35  $\mu$ m (en a, b, c y d).

**Relaciones entre capilares y fibras musculares regenerativas:**

La DF por área (tabla 1) mostró un progresivo descenso conforme avanzaba la maduración de las fibras regenerativas, pero se mantuvo más alta a los 20 días que la de los músculos controles, existiendo entre ellas diferencias significativas para  $p < 0.05$ . La DC (tabla 1) siguió un comportamiento similar a la DF, de forma que fue encontrado un progresivo descenso conforme las fibras regenerativas maduraron, existiendo diferencias significativas cuando se comparaban los músculos correspondientes a 20 días postlesión con los músculos normales. El similar comportamiento que siguieron DF y DC provocó que el índice C/F no mostrase diferencias significativas entre ninguno de los tiempos estudiados (tabla 1).

Los resultados de la distancia de difusión media (R50) y máxima (R95) mostraron valores similares para las fibras regenerativas a los 5, 7 y para las fibras tipo I a los 20 días postlesión. En cambio

las fibras regenerativas tipo II a los 20 días, en relación con las fibras normales tipo I, mostraron datos diferentes para la distancia de difusión media aunque no para la distancia de difusión máxima.

El área de músculo ocupada por intersticio en cada período analizado, descendió progresivamente, representando el 59.9%, 48.3%, 24.7% y 13,2 % respectivamente a los 5, 7, 20 días postlesión y músculo normal. Estos porcentajes fueron en todos los casos significativamente diferentes entre sí para  $p < 0.05$  (tabla 1).

	Densidad capilar	Densidad de fibras musculares	Índice Capilar / fibra	Distancia de difusión		% de intersticio
				R50	R95	
5 días pl	1590 ± 312.7	1259 ± 197.7	1.29 ± 0.35	13.3	25.0	59.9%
7 días pl	1176 ± 237.5 a	780 ± 106.2 a	1.50 ± 0.19	11.4	24.1	48.3%
20 días pl	I 761.2 ± 55.0 a, b	518.8 ± 48.1 a, b	1.46 ± 0.10	12.2	20.4	24.7%
	II 542.2 ± 48.1 a, b	427.2 ± 40.6 a, b	1.26 ± 0.80	18.9	30.0	
Control	I 701.6 ± 67.5 a, b	482.6 ± 41.4 a, b	1.47 ± 0.16	14.0	27.5	13,2 %
	II 414.2 ± 23.8 a, b, c, e	335.8 ± 26.8 a, b, c	1.23 ± 0.04	21.9	40.2	

a: significativamente diferente (s.d.) ( $p < 0.05$ ) con 5 días pl (postlesión); b: s.d. ( $p < 0.05$ ) con 7 días pl; c: s.d. ( $p < 0.05$ ) con 20 días pl (fibras tipo I); d: s.d. ( $p < 0.05$ ) con 20 días pl (fibras tipo II); e: s.d. ( $p < 0.05$ ) con control (fibras tipo I)

Tabla 1. Resultados cuantitativos del análisis de la capilarización del músculo regenerativo.

	< 5 $\mu$ m	5-10 $\mu$ m	> 10 $\mu$ m
5 días pl	10 %	50 %	40 %
7 días pl	84 %	16 %	0 %
20 días pl	95 %	5 %	0 %
Control	95 %	5 %	0 %

Tabla 2. Distancia entre células satélite y capilares.

**Relaciones entre capilares y células satélite:**

De los datos obtenidos sobre el porcentaje de distancias de difusión entre células satélite y capilares según los tramos establecidos, se comprueba que a los 5 días postlesión el 90% de las distancias eran superiores a 5  $\mu$ m, llegando un 40% de ellas a más de 10  $\mu$ m. A los 7 días postlesión tiene lugar una rápida normalización de las distancias llegando a ser un 84% el número de células satélite situadas a una distancia <5  $\mu$ m de un capilar.

La cuantificación del número de células satélite que se encontraban junto a un capilar fue de 46±8%, 73±4%, 86±5% a los 5, 7 y 20 días postlesión respectivamente. En la fig.2 se muestran imágenes representativas de células satélite y capilares en los distintos períodos analizados.

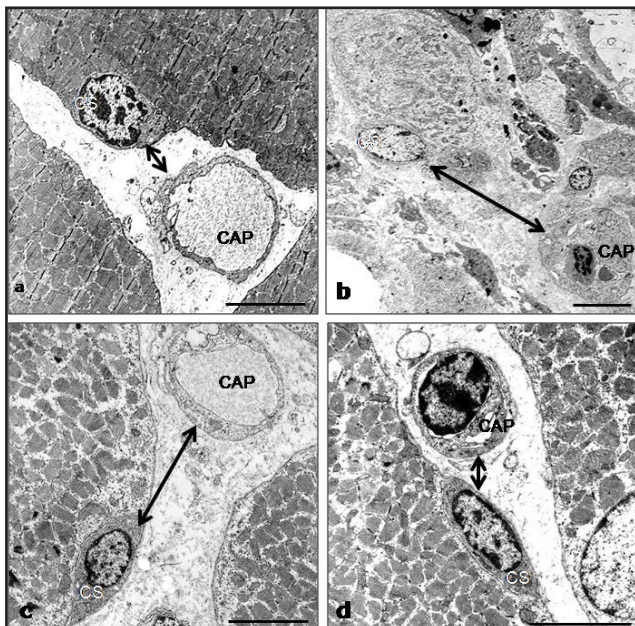


Figura 2. Micrografías electrónicas correspondientes a músculos control (a), 5 días (b), 7 (c) y 20 días postlesión (d). Obsérvese la distancia (flecha) que separa la célula satélite (CS) y el capilar (CAP). (a) x3900, (b) x1200, (c) x3900 (d) x5200. Barra de calibración = 5  $\mu$ m (en a, b, c y d).

## DISCUSIÓN

### Sobre las distancias de difusión capilares - fibras musculares regenerativas:

Durante el proceso de la regeneración muscular tienen lugar cambios en el patrón microvascular que acompaña a las fibras musculares regenerativas durante su crecimiento y maduración. Estos cambios, que incluyen un inicial aumento de la DC que retorna gradualmente hasta valores normales en la etapa final del proceso, parecen estar gobernados por el progresivo incremento en el tamaño de las fibras regenerativas (11). Además, el hecho de que se encuentren rodeadas por un mayor número de capilares y el área de fibra abastecida por cada capilar es menor, parece, en principio, una mejora en la difusión para la fibra regenerativa en crecimiento (12, 16). Sin embargo los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que las distancias de difusión que acompañan a las fibras musculares regenerativas durante su maduración y crecimiento no son más cortas, sino que mantienen valores similares a las de las fibras musculares tipo I normales a los 5 y 7 días postlesión y estableciéndose distancias de difusión similares para fibras tipo I y II a los 20 días. Por tanto, la mayor densidad capilar que se establece durante las fases más tempranas de la regeneración muscular podría no significar, necesariamente, una mayor oxigenación.

Un dato que puede justificar que las fibras regenerativas no presentaran distancias de difusión más cortas sería la ausencia de modificaciones en el índice C/F. En el músculo maduro la distancia de difusión está condicionada no sólo por la densidad capilar y el tamaño de las fibras musculares, sino también por el índice capilar fibra (18, 19, 20). De hecho, el establecimiento de distancias de difusión más cortas como mecanismo adaptativo para una mejor oxigenación conlleva un incremento en la densidad capilar, un descenso en el área de las fibras y un aumento en el índice capilar/fibra (17). Sin embargo, en nuestro caso, aunque el número de capilares/área aumentaba también lo hace paralelamente el número de fibras por área, dado que en la regeneración tiene lugar un proceso de neoformación de miofibras. Por tanto, la ausencia de un aumento en el índice C/F influiría en que las distancias de difusión para las fibras de los estadios regenerativos analizados no hayan sido más cortas que las encontradas en las fibras de los músculos controles.

Por otro lado aunque las distancias de difusión para las fibras regenerativas a los 5 y 7 días fueron similares a las fibras normales tipo I esto no implica necesidades metabólicas similares. Es conocido que las fibras tipo I (oxidativas) normales, que requieren por su metabolismo un mayor suministro de oxígeno, están rodeadas de un mayor número de capilares y son más pequeñas en tamaño para favorecer la difusión desde los capilares (21, 22). Sin embargo, a pesar de mantener distancias de difusión similares, el tamaño de las fibras musculares regenerativas a los 5 y 7 días postlesión es significativamente menor en comparación con las fibras tipo I normales (alrededor de un 80% y 58% más pequeñas respectivamente) (12). Esto indica una mayor separación de la fibra regenerativa de los capilares que la rodean lo que viene dado por la existencia de un mayor espacio intersticial como revelaron nuestros resultados (60%, 48% y 25% a los 5, 7 y 20 días postlesión respectivamente, frente a un 13% en músculo normal) como consecuencia de la importante remodelación de la matriz extracelular en la regeneración (8).

Es razonable pensar que para que las fibras regenerativas a los 5 y 7 días, aún siendo menores en tamaño, mantuviesen distancias de difusión similares a las fibras tipo I normales, la posición de los capilares se habría modificado escasamente de la posición original en el músculo sano. Schmalbruch (23), ha señalado que a diferencia de lo que ocurre en la miogénesis embrionaria donde las fibras musculares se desarrollan conjuntamente con el tejido conectivo y el sistema capilar, durante la regeneración las nuevas miofibras tienen que adaptarse a un almacén endomisial preexistente, al igual que ocurre en la regeneración capilar (24).

Por tanto los resultados obtenidos para la distancias de difusión apuntan a que las necesidades de las fibras regenerativas inicialmente no requieren de una mayor oxigenación. Se asume que los capilares dispuestos a la distancia de 5  $\mu$ m o menos de la superficie de la fibra están abasteciendo a la fibra muscular (25). Por tanto, en base a nuestros datos, las fibras musculares regenerativas a los 5 días postlesión, a pesar de encontrarse rodeadas de un mayor número de capilares (12), no parecían recibir una mayor oxigenación desde el punto de vista funcional. Esto está en buena relación con el hecho de los miotubos regenerativos más jóvenes tienen pocas mitocondrias, metabolismo aeróbico moderado y una aumentada actividad anaeróbica (26, 27, 28) y baja tinción la enzima succínico deshidrogenasa (29). Asimismo, Duguez et al (30) han mostrado que a partir del quinto día tras la lesión por bupivacaína se produce en las fibras regenerativas una biogénesis mitocondrial indicada por el incremento de la actividad citrato sintetasa, pero que se mantiene por debajo de los valores normales al día 10 postlesión (31). Por tanto la mayor capilarización podría obedecer a una proliferación vascular asociada al propio proceso degenerativo-regenerativo más a que un mayor requerimiento de oxígeno y nutrientes por parte de las fibras musculares. En este sentido, se ha comprobado in vitro que una situación de hipoxia asociada a la presencia de productos de degradación de la matriz extracelular induce proliferación y migración de células madre perivasculares (32) y que las células endoteliales juegan un papel fundamental sobre la diferenciación de las fibras musculares, la vascularización y la innervación (33).

La aproximación de las distancias de difusión que acompañan a las fibras regenerativas a los 20 días postlesión a los valores obtenidos para las fibras tipo I y II normales reflejarían, además de una normalización en las relaciones entre la red capilar y los tipos de fibras musculares, la recuperación estructural de su relación garantizando el adecuado suministro de oxígeno (28). Esta normalización de la red capilar, que también es evidente a nivel ultraestructural (34), precisa en la fase de remodelación de una adecuada reorganización del tejido conectivo conjuntamente con el desarrollo de las fibras regenerativas que de verse desequilibrada conduciría a la fibrosis (35) dificultando su abastecimiento sanguíneo al aumentar las distancias de difusión y favoreciendo su degeneración (36).

### Sobre las distancias de difusión capilares- células satélites:

Nuestros resultados confirman la íntima relación entre las células satélites y capilares (88%) referida por Christov et al (3) ya que en los músculos de animales controles un 86% de las células

satélites se encontraban junto a un capilar. Sin embargo, hemos comprobado que a los 5 días sólo el 46.8% de las células satélites están próximas a un capilar, lo que indica que en etapas iniciales de la maduración de las fibras musculares regenerativas, a pesar del incremento en el número de capilares y de células satélites (13), no se mantiene la correlación positiva entre ambos aunque se recupera en fases más avanzadas. Esto contradice lo señalado por Mounier et al (5) para quienes la célula satélite mantiene su posición yuxtavascular durante la regeneración y, mientras que ellas se diferencian, pueden beneficiarse in vivo de las señales de apoyo por parte de las células vasculares. En nuestra opinión, nuestros datos plantean la posibilidad de que al menos una parte de la población de células satélites pudiera, al menos inicialmente, no estar sometida al "influjó" vascular al no mantenerse la relación topográfica entre ambos.

Además, sólo un 10% de las células satélites asociadas a las fibras musculares regenerativas a los 4 días postlesión se encontraban a una distancia inferior a 5 µm, mientras que un 50% y un 40% mantenían distancias de 5-10 µm y más de 10 µm respectivamente. Por tanto, estos datos también hablan a favor de que en esta etapa los nichos no están aún configurados ya que resultados de Christov et al (3) muestran que la distancia que separa las células satélites de los capilares era de 2.6±3.3 µm; por consiguiente, y a pesar de encontrarse incrementados en número tanto los capilares como el número de células satélites (11, 12, 13), el funcionamiento de éstas inicialmente dependería de otros factores y tipos celulares. Así se ha comprobado que durante la regeneración tanto los macrófagos (37) como los fibroblastos (38) desempeñan un papel fundamental en la diferenciación y estabilidad en la población de células satélites y en su contribución al crecimiento de la fibra muscular regenerativa. En cualquier caso, parece ser que los mioblastos no proliferan ni se diferencian en distancias superiores a unas 150 µm del suministro de oxígeno (39); no obstante las distancias a las que se encontraban las células satélites de los capilares siempre fueron menores a 150 µm.

Por el contrario, cuando las fibras musculares regenerativas maduran y crecen, tanto el número de células satélites junto a un capilar y las distancias entre ambos se aproximan a valores normales a los 7 días y son similares a los 20 días. Esto, junto con el hecho de que el número de células satélites y su grado de activación son similares a los valores normales (13), sugiere que el reestablecimiento de los nichos podría estar implicado en el control de la situación de quiescencia de las células satélites. Se ha planteado que los pericitos próximos al nicho de la célula satélite pueden secretar factores como la angiopoyetina 1 que contribuye al mantenimiento de la quiescencia de la célula satélite (5).

En conclusión, a diferencia de lo generalmente aceptado, nuestros resultados parecen indicar que la mayor densidad capilar podría no estar ligada a unas mayores necesidades de oxigenación de las fibras musculares regenerativas ni tampoco las células satélites mantienen las relaciones topográficas con los capilares que muestran en el músculo normal. Aunque se precisan más estudios que lo corroboren, nuestros datos estructurales sugieren una baja oxigenación en las primeras etapas de la fase de remodelación en la regeneración muscular lo que está en buena relación con recientes estudios in vitro que demuestran que una baja concentración de oxígeno favorece la miogénesis (32, 40).

## REFERENCIAS

- Lexell J. Muscle capillarization: Morphological and morphometrical analysis of biopsy samples. *Muscle Nerve* 1997; 20: S110-S112.
- Porter MM, Koolage CW, Lexell J. Biopsy sampling requirements for the estimation of muscle capillarization. *Muscle Nerve* 2002; 26: 546-548.
- Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: Close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1397-409.
- Cosgrove BD, Sacco A, Gilbert PM, Blau HM. A home away from home: Challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches. *Differentiation* 2009; 78: 185-194.
- Mounier R, Chretien F, Chazaud B. Blood vessels and the satellite cell niche. *Curr Top Dev Biol* 2011; 96: 121-138.
- Tajbakhsh S, Relaix F. From development to regeneration of skeletal muscle. *Biofutur* 2011; 321: 50-52.
- Jarvinen TAH, Jarvinen TLN, Kaariainen M, Äärämaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007; 21:317-331.
- Grounds MD, McGeachie JK, Davies MJ, Sorokin LM, Maley MAL. The expression of extracellular matrix during adult skeletal muscle regeneration: How the basement membrane, interstitium and myogenic cells collaborate. *Basic Appl Myol* 1998; 8: 129-141.
- Harris JB. Myotoxic phospholipases A(2) and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicol* 2003; 42: 933-945.
- Ullman M, Oldfors A. Skeletal-muscle regeneration in young-rats is dependent on growth-hormone. *J Neuro Sci* 1991; 106: 67-74.
- Luque E, Pena J, Alonso PJ, Jimena I. Microvascular pattern during the growth of regenerating muscle-fibers in the rat. *Ann Anat* 1992; 174: 245-249.
- Luque E, Peña J, Martin P, Jimena I, Vaamonde R. Capillary supply during development of individual regenerating muscle fibers. *Anat Histol Embryol* 1995; 24: 87-89.
- Luque E, Peña J, Salas P, Jimena I, Martin JD. Changes in satellite cell population associated with regenerating muscle fibers in rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28: 305-311.
- Scholz D, Thomas S, Sass S, Podzuweit T. Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Mol. Cell. Biochem* 2003; 246: 57-67.
- Plyley MJ. The capillary supply of skeletal muscle. *Can J Sport Sci* 1989; 14: 130-131.
- Plyley M, Green H, McKee N. Capillary supply in regenerated skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 1992;S168.
- Bae KA, An NY, Kwon YW, et al. Muscle fibre size and capillarity in Korean diving women. *Acta Physiol Scand* 2003; 179: 167-172.
- Kayar SR, Hoppeler H, Essengustavsson B, Schwerzmann K. The similarity of mitochondrial distribution in equine skeletal muscles of differing oxidative capacity. *J Exp Biol* 1988; 137: 253-263.
- Snyder GK. Estimating diffusion distances in muscle. *J Appl Physiol* 1987; 63: 2154-2158.
- Snyder GK. Capillarity and diffusion distances in skeletal-muscles in birds. *J Comp Physiol [B]* 1990; 160: 583-591.
- Hughes SM, Schiaffino S. Control of muscle fibre size: a crucial factor in ageing. *Acta Physiol Scand* 1999; 167: 307-312.
- Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Cell size and oxidative enzyme activity of type-identified fibers in rat hindlimb muscles: a review. *Acta Histochem Cytochem* 2003; 36: 105-114.
- Schmalbruch H. Muscle regeneration: fetal myogenesis in a new setting. *Bibl Anat* 1986; 29: 126-153.
- Vracko R, Benditt EP. Basal lamina - scaffold for orderly cell replacement - observations on regeneration of injured skeletal-muscle fibers and capillaries. *J Cell Biol* 1972; 55: 406-419.
- Kubnova L, Janacek J, Ribaric S, Cebasek V, Erzen I. Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. *J Muscle Res Cell Motil* 2001; 22: 217-227.
- Snow MH. Metabolic-activity during degenerative and early regenerative stages of minced skeletal-muscle. *Anat Rec* 1973; 176: 185-203.
- Wagner KR, Carlson BM, Max SR. Developmental patterns of glycolytic enzymes in regenerating skeletal-muscle after autogenous free grafting. *J Neuro Sci* 1977; 34: 373-390.
- Jarvinen TAH, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 155-161.
- Jimena I, Peña J, Luque E, Vaamonde R. Histological, histochemical and morphometric characteristics of regenerating fibers in rat skeletal

muscle. *Histol Med* 1992; 8: 31-38.

30. Duguez P, Feasson L, Denis C, Freyssenet D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E802-E809.

31. Wagatsuma A, Kotake N, Yamada S. Muscle regeneration occurs to coincide with mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biochem* 2011; 349: 139-147.

32. Tottey S, Corselli M, Jeffries EM, Londono R, Peault B, Badylak SF. Extracellular matrix degradation products and low-oxygen conditions enhance the regenerative potential of perivascular stem cells. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 37-44.

33. Criswell TL, Corona BT, Wang Z, Zhou Y, Niu G, Xu Y, Christ GJ, Soker S. The role of endothelial cells in myofiber differentiation and the vascularization and innervation of bioengineered muscle tissue in vivo. *Biomaterials* 2013; 34: 140-149.

34. Luque E, Peña J, Martin P, Jimena I, Vaamonde R. Ultrastructural and morphometric analysis of capillaries surrounding regenerating muscle-fibers in rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1995; 27: 367-374.

35. Li Y, Cummins J, Huard J. Muscle injury and repair. *Curr Opin Orthop* 2001; 12: 409-415.

36. Watkins SC, Cullen MJ. A qualitative and quantitative study of the ultrastructure of regenerating muscle-fibers in Duchenne muscular-dystrophy and polymyositis. *J Neurol Sci* 1987; 82: 181-192.

37. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* 2008; 314: 3232-3244.

38. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 2011; 138: 3625-3637.

39. Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 759-774.

40. Redshaw Z, Loughna PT. Oxygen concentration modulates the differentiation of muscle stem cells toward myogenic and adipogenic fates. *Differentiation* 2012; 84:193-202.