



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MUSCULO

**“COMUNICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO
DISTROFINA GLICOPROTEÍNA DE LA SARCOLEMA EN EL
CITOESQUELETO EN FIBRAS MUSCULARES ÚNICAS
DURANTE LA CONTRACCIÓN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JESÚS VEGA MORENO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR



MÉXICO, DF.

Abril 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MUSCULO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JESÚS VEGA MORENO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR



MÉXICO, DF.

Abril 2007.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MÚSCULO

**“COMUNICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO
DISTROFINA GLICOPROTEÍNA DE LA SARCOLEMA EN EL
CITOESQUELETO EN FIBRAS MUSCULARES ÚNICAS
DURANTE LA CONTRACCIÓN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JESÚS VEGA MORENO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR



MÉXICO, DF.

Abril 2007.

AGREDECIMIENTOS

A mis padres por todos los desvelos, el apoyo, amor y comprensión que me han brindado en toda mi vida, pero en especial para la realización de este trabajo sin su apoyo no lo hubiese logrado.

A la Dra. Alicia Ortega por la confianza que ha brindando para la realización de este trabajo y por los consejos y su valioso tiempo que me ha dado, ya que me han hecho crecer como profesional y como persona. De ante mano muchas gracias.

A los miembros del jurado:

M en C. Luis Sánchez Sánchez

Dra. Alicia Ortega Aguilar

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Dra. Lucila Álvarez Barrera.

Por todo su tiempo y consejos que enriquecieron mi trabajo.

A Rosy y Al Dr. Hugo por su tiempo en la enseñanza de técnicas que me facilitaron la realización de este trabajo.

A mis hermanos Oscar, Cesar, Lupe, Mónica, Julia y luz gracias carnales por todo su apoyo, comprensión, por lo enojos que nos unen mas como hermanos.

A Mónica y Arnulfo por todo su apoyo durante mi vida que me facilitaron mucho este camino.

A Guadalupe Bribiesca por su amistad, cariño y consejos, gracias flaca.

A Eva, Chava, Adriana, David, Jorge, Ivonne, Itzel, Evelin, Reyna, Diana, Efrén, Omar, Olivia, que facilitaron mis primeros pasos en la universidad y todos los momentos agradables que pasamos juntos.

A Bere, Ana, Karla, Checa, Eva cristina, Mónica, Cristian, Gerardo, Alicia, Paco por todos los momentos padres que pasamos en las salidas a campo, y los últimos semestres de la carrera que los hicieron mas agradables.

A Luis Alberto por todo su apoyo y tiempo brindado para perfeccionar este trabajo y sobre todo por su amistad.

A Claudine, Rosy, Paco, Ricardo, Aldo, Pavel, Higinio, Joel, Laura, gracias por dejarme integrar en su quipo de trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos que facilitaron mucho mi camino

A Eva, Chava, Adriana, David, Jorge, Ivonne, Itzel, Evelin, Luis, Diana, Efrén, Omar, Ana, Bere, Karla, Checa, Eva cristina, Mónica, Cristian, Gerardo, Alicia, Lupita, por su amistad que hicieron de la universidad una estancia agradable.

A Reyna por los momentos buenos y malos que pasamos juntos.

A Lupe, Marcela, Yessi, Tania, Enrique, Marcos por su amistad en toda mi vida gracias chavos.

A mis cuñados Arnulfo, Daniel, Marina, Cristina, Esteban, por todo su apoyo.

A mis sobrinos Mario, Chabe, Miguel, Lalo, Karen, Xenia, Oswaldo, Axel, Paola y Cesar que han venido a iluminar mi vida.

INDICE

INDICE	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
Tejido muscular	3
Potencial de acción	8
Origen embrionario y desarrollo del músculo esquelético.....	9
Tipos de fibras musculares esqueléticas.....	11
Clasificación de las fibras del músculo esquelético por su velocidad de contracción	12
Tipos de Fibras	12
Características metabólicas de los tipos de fibras musculares.....	13
Mecanismo de la contracción	13
Irrigación e innervación muscular.....	13
Descripción estructural del complejo Distrofina-Glicoproteína (DGP) en el músculo esquelético.....	15
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODO	21
Manejo de animales	21
Disección del músculo EDL	21
Disección de fibra única	22
Contracción de la fibra	23
Marcaje de las proteínas del complejo EDL en la fibra	24
Anticuerpos	25
Microscopia confocal	25
Determinación de la longitud en los espacios sarcomericos.....	26
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
CONCLUSIONES	40
ANEXO 1(Abreviaturas)	41
ANEXO 2 (Glosario)	42
BIBLIOGRAFIA	43

RESUMEN

El tejido muscular estriado es de origen mesenquimático y conforma aproximadamente el 70% de los tejidos de vertebrados en la edad adulta. El músculo esquelético se compone de *fibras* (células) largas y cilíndricas de 10 a 100 μm de diámetro y hasta 30 cm. de largo en el humano. Estas fibras están rodeadas por una membrana que recibe el nombre de *sarcolema* y al citoplasma se le denomina *sarcoplasma*. La fibra muscular contiene múltiples núcleos colocados en la periferia y una serie de proteínas fibrilares denominadas *miofibrillas* que tienen un arreglo paralelo al eje longitudinal. Cuando se hace pasar un rayo de luz polarizada, las fibras se observan al microscopio, con estriaciones, bandas claras y oscuras a las que se les ha nombrado Bandas A (Anisotrópicas) y Bandas I (isotrópicas). Se ha demostrado que dichas Bandas se componen de proteínas (actina y miosina) principalmente que forman los filamentos delgados y gruesos respectivamente. Los puntos medios a nivel de filamentos de actina se encuentran en contacto con un conjunto de proteínas dispuestas transversalmente al eje de la fibra, dando una imagen en el microscopio de una línea, conocida como *la línea Z* (o *disco Z*). La distancia entre un disco Z y otro Disco Z, se le denomina *Sarcomera* y es la unidad funcional del músculo. Las proteínas localizadas en la *línea Z*, unen al aparato contráctil con la *Sarcolema* dando origen al complejo de proteínas distribuidas denominado *costameras* (costillas), son éstas proteínas las que se comunican con el **complejo distrofina- glucoproteína (DGP)** que está conformado por un grupo de proteínas membranales, periféricas e integrales que proporcionan un vínculo estructural entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de la fibra muscular y sirven presumiblemente, para transmitir la fuerza lateral durante la contracción, para rendir una sumatoria de fuerzas durante la contracción del un músculo entero. Para la localización de las proteínas del complejo DGP se utilizó una fibra aislada del músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de rata macho y a través de la técnica de microscopía confocal se localizaron a las proteínas α -Distroglicano y Laminina, en la cara externa de la Sarcolema en contacto con o en la matriz extracelular respectivamente, y la fibra no mostró patrón sarcómero definido. El β -distroglicano se localiza en la parte interna del sarcolema sin tocar la matriz extracelular. La distrofina se localiza en la pared interna de la membrana del sarcolema presentando un patrón sarcómero definido. La α -actina se encuentra muy concentrada en la zona central de la fibra relacionada con el aparato contráctil de la fibra muscular. La caveolina-3 tiene localización membranal en la Sarcolema y en los *tubulos transversos*, que son invaginaciones de la Sarcolema y se distribuyen en todo el interior de la fibra muscular. La localización del *gangliosido GM1* está a todo lo largo del sarcolema y en el interior de la fibra siguiendo la distribución de los tubulos transversos principalmente. Las *Unidades de Contractura*, como las hemos denominado en este trabajo, son estructuras que pueden estar asociadas con la distribución de una proteína que se localiza en la Sarcomera, llamada *titina* proteína importante durante el proceso de acortamiento y estiramiento pasivo de la fibra muscular.

INTRODUCCIÓN

TEJIDO MUSCULAR

El tejido muscular estriado es de origen mesenquimático y conforma aproximadamente el 70% de los tejidos de vertebrados en la edad adulta. El tejido muscular está constituido por células musculares llamadas fibras, cuya función es transformar energía química en energía mecánica. El Músculo esquelético realiza su trabajo gracias a tres características funcionales: Excitabilidad, Contractilidad y Relajación (William F. 2000). La característica de Excitabilidad del músculo esquelético es la que le permite a éste ser estimulado por un impulso nervioso, ésta propiedad lo llevará a la segunda característica que es la Contractilidad, donde el músculo luego de ser estimulado por el nervio, recibe dicha información a lo largo de todas sus fibras musculares y las acorta para lograr la función propia que es la Contracción. Luego de que el músculo realiza la función determinada, este debe recobrar su forma para evitar una alteración en el mismo por su contracción sostenida y es en ese caso cuando alcanza la tercera característica funcional denominada Relajación, donde simplemente sus fibras contraídas se relajan y esperan nuevamente ser estimuladas (William F. 2000).

El músculo está formado por manojos de células cilíndricas (10-100 μm) muy largas (de hasta 30 cm.), son multinucleadas (Rumberger E. 2002). La fibra muscular está rodeada por una membrana de tejido conectivo llamada *endomisia*, grupos de fibras están unidos por otra capa de tejido conectivo llamada *perimisia* que las agrupa en racimos y finalmente al conjunto de racimos que conforman al músculo lo rodea otra membrana de tejido conectivo denominada *epimisia* (Figura 1A) (Arthur W. Ham 1985). Los vasos sanguíneos atraviesan el epimisia, lo que garantiza la vascularización del músculo. El músculo estriado presenta bajo el microscopio de luz, estriaciones transversales que tienen una regularidad a lo largo de la fibra (Figura 1A) y que corresponden a la distribución de las proteínas del aparato contráctil; Actina y Miosina que forman la *Sarcomera*, unidad morfológica y funcional del músculo (Figura 1B) (Ganong 2000).

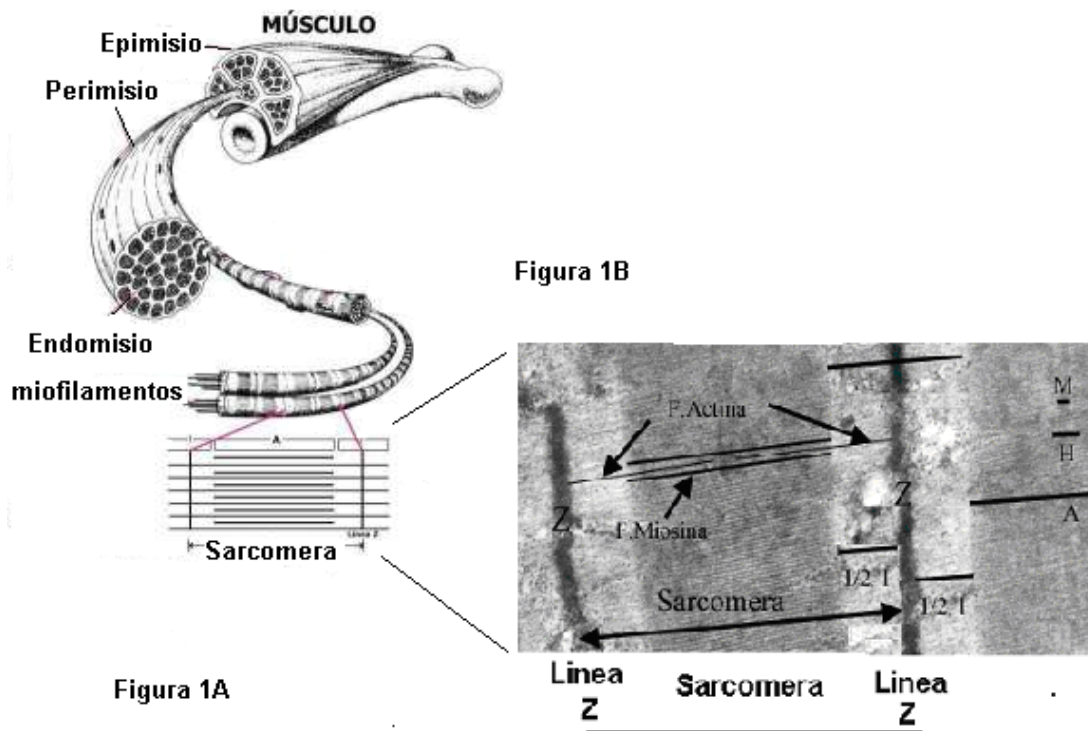


Fig.1. (A) La estructura del músculo esquelético desde su composición general hasta la estructura de una sola fibra, (B) composición proteica de la sarcomera, mostrando la presencia de las bandas I, que contienen principalmente actina y la presencia de las Bandas A, que contienen ambas proteínas, actina y miosina.

La *Sarcomera* está comprendida entre dos **líneas Z**. Cada miofibrilla contiene numerosos sarcómeros. Los sarcómeros presentan unas **Bandas A** que se ven como bandas anchas y oscuras (estrías transversales) que alternan con otras claras y estrechas denominadas **Bandas I**. Estas bandas están compuestas de las miofibrillas de *f-actina* y *miosina* principalmente, la miosina es parte fundamental de las bandas A y la *f-actina* de las Bandas I, en las líneas Z hay una gran cantidad de proteínas que unen al citoesqueleto con la Sarcolema como lo es la α -actina, por otro lado, la *anquirina* es una proteína que se encuentra en la línea Z y une proteínas que van de línea Z a línea M (medio Sarcómero) a través de la proteína llamada *titina*, la proteína monomérica mas grande hasta ahora descrita (~30,000 aa) (Figura 2) (Larios Escalante A. 1998). Durante la contracción, la titina se enrolla en dominios específicos, siguiendo el desplazamiento de la *f-actina* y *miosina*, que consiste en un acortamiento longitudinal de la fibra pero con un aumento del volumen, lo que resulta en un incremento de la distancia transversal, este aumento de volumen incrementa la tensión a través de las proteínas del cito esqueleto a la matriz extracelular a través de las proteínas Sarcolemas, a este conjunto de proteínas involucradas en la transmisión de fuerza lateral se les conoce como *Costameras* (Robert J. Bloch y González-Serratos. 2003) (Figura 2).

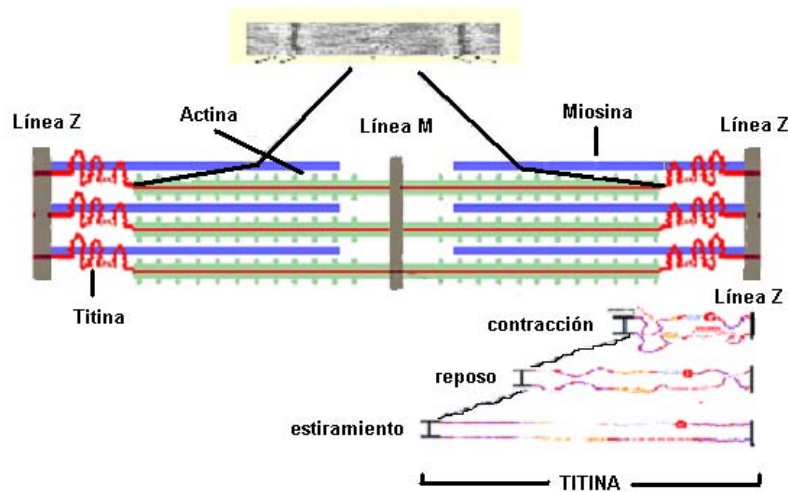


Figura 2. Proteínas Sarcomericas encargadas de la transmisión de Fuerza longitudinal durante la Contracción/Relajación

La Sarcolema es la primera parte de la fibra muscular que experimenta cambios durante la estimulación, para inmediatamente después iniciar cambios intracelulares que se reflejan nuevamente en las membranas celulares. La inervación del tejido muscular esquelético se relaciona directamente con la regulación de la contracción de cada fibra muscular y en consecuencia con el estado de tensión del músculo completo. Cada fibra muscular recibe una terminación del axón de una neurona motora, formándose en la Sarcolema una zona de unión denominada placa motora (Figura 3) (Arthur W. Ham 1985).

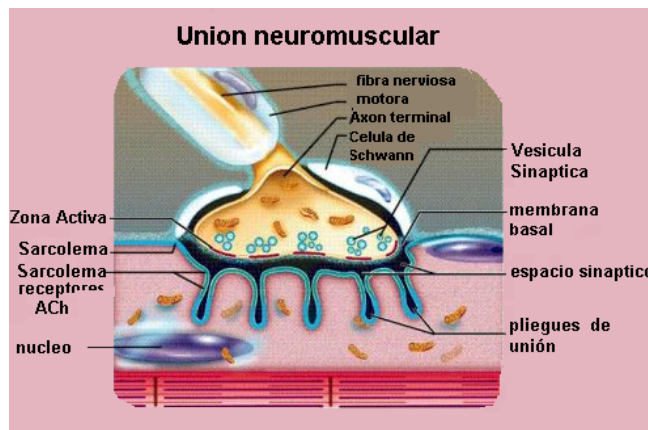


Figura 3 .Placa motora terminal esta constituida por la participación de dos células, la membrana sináptica de la motoneurona y la región del sarcolema en la fibra muscular.

La Sarcolema, esta formada por lípidos y proteínas que tienen una distribución semejante a la distribución de las proteínas en la sarcomera. Las principales proteínas sarcomericas tanto las que se distribuyen de manera: a) longitudinal como los son la f-actina, miosina y titina (Figura 2), y b) las que tienen una distribución transversal, paralelas a la línea Z y Línea M, como lo son; la

anquirina, la distrofina, la vimentina, el β -destroglicano, α -destroglicano, la α -actina, desmina, espectrina, vinculina, etc. (Figura 4) (James M. Ervasti, 2003).

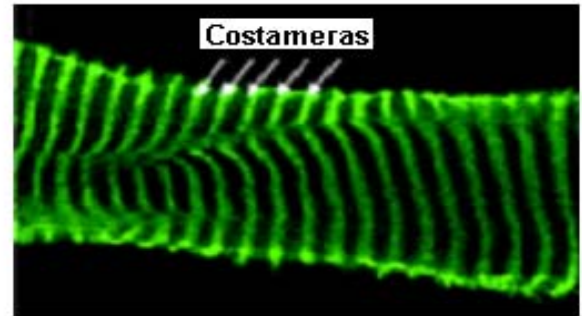
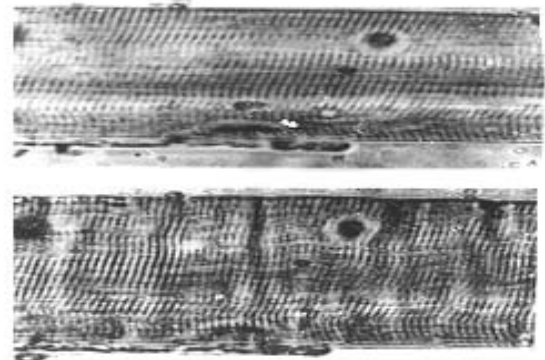
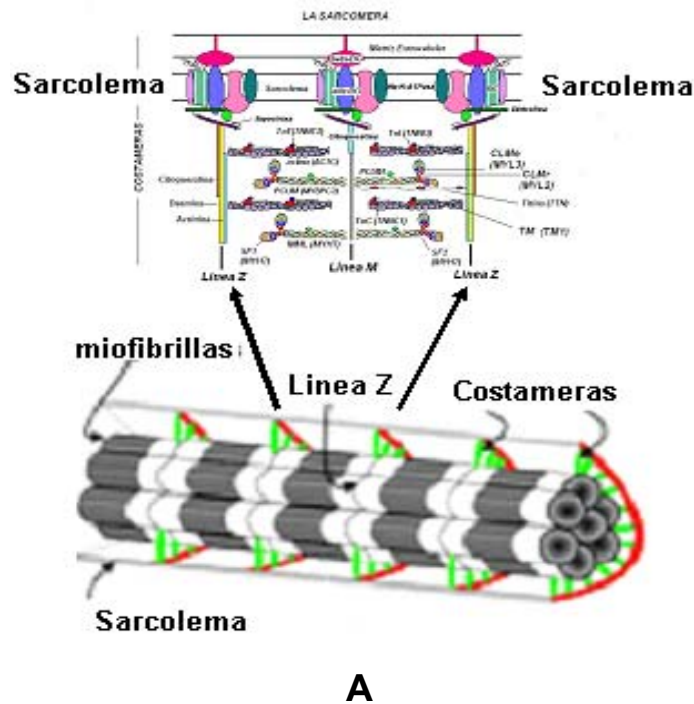


Figura 4. (A). Proteínas sarcoméricas con distribución transversal: Mecanismo Molecular de la Transmisión de Fuerza Lateral. (B). Microscopía de una fibra vista con microscopio de luz que muestra a los sarcómeros en una fibra relajada y otra en contracción. Imagen de microscopía confocal, marcando a la espectrina, proteína costamérica.

De manera semejante a la distribución sarcomérica de las proteínas, la Sarcolemma (membrana plasmática) se invagina para dar lugar a una amplia red de membranas que cruza a la fibra de manera transversal y longitudinal, a este sistema membranal se le conoce como *Tubulos Transversos (TT)* (figura 5A). Los TT tienen dos funciones principales: 1) transmitir el potencial de acción al interior de la fibra e iniciar el acople excitación contracción, de hecho, el 95% de los canales de calcio voltaje dependiente se encuentran en los TT (Figura 4B) y 2) En los tubulos transversos se expresan los transportadores de glucosa (Glut4) que son inducidos tanto por la presencia de insulina como por la actividad muscular (Bastian 1998). La presencia de los Glut4 en los Tubulos transversos, garantiza el aporte energético para el crecimiento de la fibra y como fuente de energía para la actividad del tejido más abundante de los vertebrados.

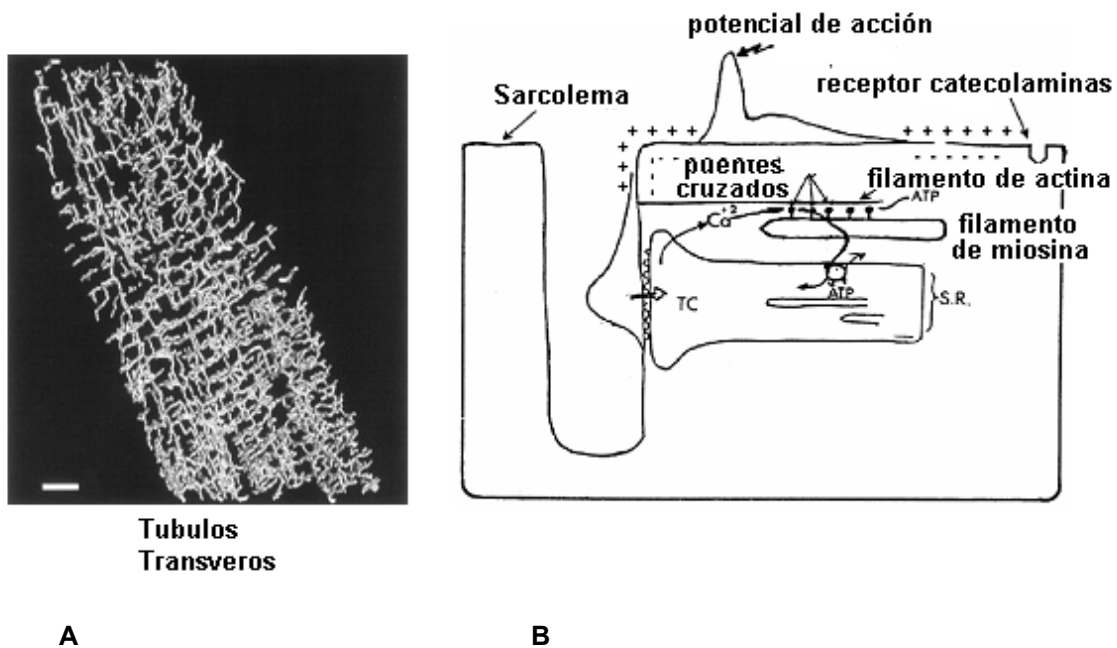


Figura 5. (A) representación esquemática tridimensional de los tubulos transversos. (B) representación esquemática de la propagación del Potencial de Acción a través de la Sarcolema a los tubulos transversos y su comunicación con las membranas intracelulares como el Reticulo Sarcoplasmico (RS). Las Cisternas Terminales del RS (CT).

El potencial de membrana es el [voltaje](#) de la diferencia de [potencial eléctrico](#) a un lado y al otro de la membrana plasmática de una célula. La [membrana](#) de las [células](#) está polarizada, debido a que hay un reparto desigual de cargas eléctricas entre el interior y el exterior de la célula. Esto crea una diferencia de potencial, siendo el exterior positivo respecto al interior (Stuart,1998). En reposo (equilibrio dinámico) el potencial de membrana viene determinado por los iones de K^+ y Na^+ . Al ser la membrana mucho más permeable (unas 40 veces) a los iones de K^+ , el potencial de equilibrio está más cerca de la tensión de equilibrio debida sólo al K^+ (Figura 5B) **Potencial de membrana en reposo: -60 mv** (Stuart. 1998) la proteína encargada de mantener el equilibrio de los iones Na^+ y K^+ , es la ATPasa, ésta proteína hidroliza un ATP y moviliza tres iones Na^+ hacia el espacio extracelular, por dos iones K^+ , al espacio citoplásmico (Figura 6). Esta proteína también se encuentra localizada en lo que se conoce como proteínas *Costamericas*. En este proceso consume energía: moléculas de ATP, que transforma en ADP. El 70% del consumo energético de la membrana celular se invierte en activar las bombas de sodio-potasio (Stuart, 1998).

La membrana de la célula, que la aísla del exterior, está formada por una doble capa fosfolípida que no deja pasar los iones disueltos en el medio que la rodea. En esta capa están intercaladas dos tipos de estructuras que, en determinadas condiciones, permiten el paso de iones:

- Canales de iones
- Bombas de iones

De especial interés son los canales de Na^+ y de K^+ , así como la bomba de iones sodio-potasio, pues son los que van a determinar la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula.

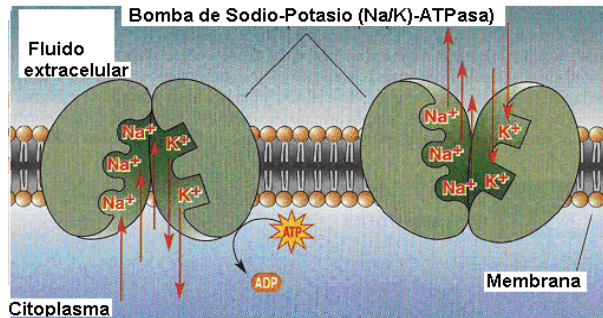


Figura 6. Muestra la salida de sodio y la entrada de potasio a través de la Sarcolema.

El movimiento de los iones se debe fundamentalmente a dos efectos:

- ❖ Difusión: en presencia de un gradiente de concentración
- ❖ Atracción eléctrica: en presencia de un campo eléctrico.

En condiciones normales, en el interior de la célula hay una concentración 20 veces superior que en el exterior de iones de K^+ . Ello hace que a través de los canales de K^+ se produzca un flujo de iones hacia el exterior. Este flujo a su vez hace que el interior de la célula adquiera una carga negativa, que tiende a contrarrestar el flujo debido a la difusión. Las dos fuerzas (difusión y campo eléctrico) se compensan cuando la diferencia de potencial entre el interior y el exterior es de -80mv (en ausencia de otros iones o de canales que permitan la difusión de otros iones).

La bomba de sodio-potasio tiene como misión mantener la diferencia de concentración de iones de sodio y de potasio entre el interior y el exterior de la membrana celular. Dado que el potencial de membrana no es ni el que corresponde al equilibrio de K^+ ni al de Na^+ , existe un cierto flujo de iones a través de los respectivos canales. Este flujo al cabo del tiempo variaría el equilibrio si no se viera compensado por la bomba de iones.

POTENCIAL DE ACCIÓN

Si, por algún motivo, la célula se despolariza por encima de unos -48mv , se abren más canales de Na^+ (canales dependientes de la tensión). Entonces aumenta el flujo de iones Na^+ y la tensión se acerca al punto de equilibrio para el Na^+ , llegando a unos $+55\text{mv}$. Este es un proceso rápido.

Al producirse esta despolarización de la célula, lentamente se producen dos efectos:

- los canales de Na⁺ recién abiertos vuelven a cerrarse
- nuevos canales de K⁺ (dependientes de la tensión) se abren.

El potencial de acción es la composición de los potenciales debidos a los iones de Na⁺ (canales de apertura rápida y cierre lento) y de K⁺ (canales de apertura y cierre lento). Aquí se consideran sólo los canales adicionales, dependientes de la tensión (no los que están abiertos siempre, manteniendo las condiciones de reposo)

ION	CONCENTRACION (mmol/L)		Potencial En equilibrio (mV)
	Líquido intracelular	Líquido extracelular	
Na ⁺	12	145	+65
K ⁺	155	4	-95
H ⁺	13 x 10 ⁻⁵	3.8 x 10 ⁻⁵	-32
Cl ⁻	3.8	120	-90
HCO ₃ ⁻	8	27	-32

Tabla 1. Distribución en reposo de los iones en los compartimentos intracelulares y extracelulares del músculo esquelético de mamífero, y los potenciales de equilibrio de dichos iones.

ORIGEN EMBRIONARIO Y DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

El músculo esquelético tiene origen en el mesodermo axial, en estructuras, llamadas somitas, que se forman como agregados de células a lo largo de todo el embrión; con características del tipo de los fibroblastos (Langman, 2004). Estas células primordiales se diferenciarán hacia mioblastos y de ahí a miotúbos o miofibras bajo la influencia de un grupo de genes y proteínas nucleares (factores de transcripción) pertenecientes a la familia de los *MyoD* como se puede observar en la figura 2. Dichos mioblastos sufren un proceso de multiplicación celular llamado hiperplasia que dará origen a dos tipos de células principalmente: primarias y secundarias.

Los mioblastos primarios se alinean unos con otros para fusionarse y formar células alargadas fusiformes con múltiples núcleos que se van alineando hacia la periferia. En esta etapa la fibra muscular está ya casi madura y se le nombra miocito (Figura 7). Por otro lado, los mioblastos secundarios se van alineando en la periferia del miotúbulo para diferenciarse y dar lugar a las células satélite, cuya función será favorecer el crecimiento de la miofibra madura al incorporarse a esta e incrementar el material para la síntesis de proteína, que será de ahora en adelante la forma en que el músculo ganará volumen, a este proceso se le llama hipertrofia (Langman, 2004).

Durante este proceso de diferenciación y crecimiento del tejido muscular, están implicados una serie de factores de crecimiento, factores hormonales y nutricionales (Langman, 2004) que determinan la predominancia y el fenotipo muscular en la edad adulta.

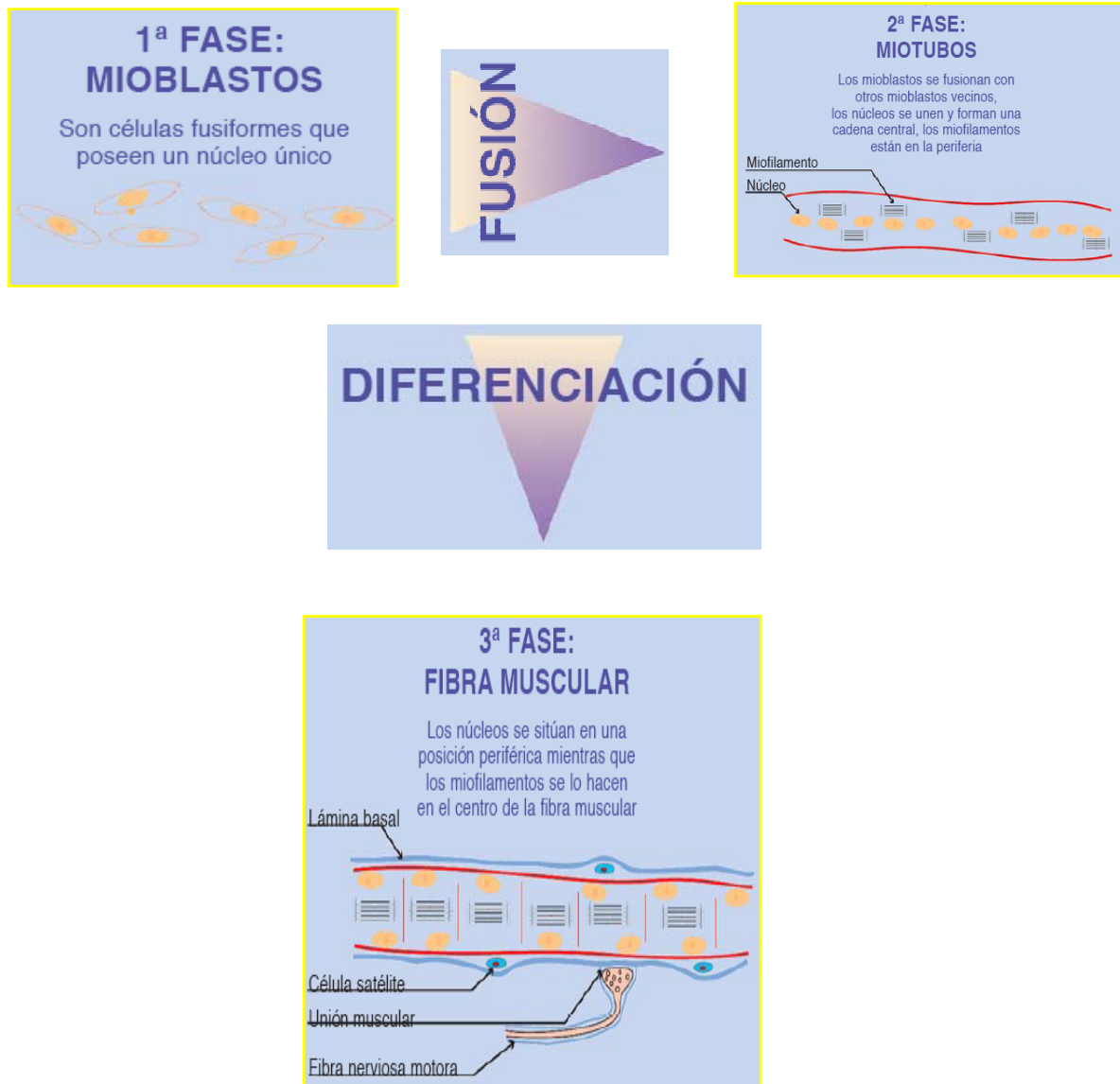


Figura 7. Miogénesis de una fibra muscular El miotubo, que resulta de la fusión de varios mioblastos, se diferencia en fibra muscular madura (núcleos múltiples en la periferia). Los axones procedentes de las neuronas de la médula espinal crean una unión neuromuscular hacia la décima semana de la vida embrionaria.

TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Se distinguen 3 tipos de fibras musculares esqueléticas: rojas, blancas e intermedias (Arthur W Ham, 1985).

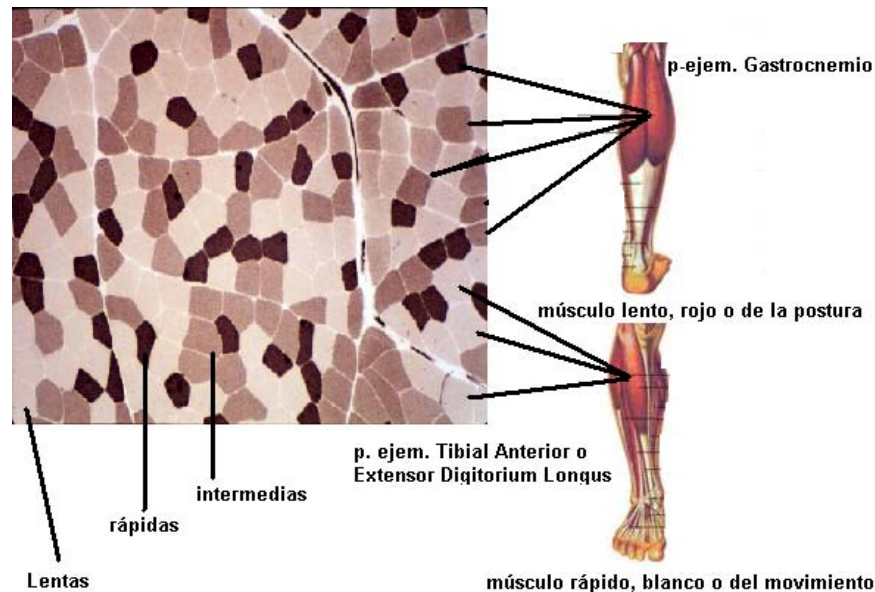


Figura 8. Diferentes tipos de fibras musculares

A) Las fibras rojas, que abundan en los músculos rojos, son de diámetro pequeño y contienen gran cantidad de mioglobina y numerosas mitocondrias, que se disponen en filas entre las miofibrillas y en acúmulos por debajo del sarcolema (Figura 8). Los músculos rojos se contraen más lentamente, por lo que se ha asumido que la fibra roja es una fibra lenta.

B) Las fibras blancas, presentes en los músculos blancos, son de diámetro mayor, poseen menor cantidad de mioglobina y un número menor de mitocondrias que se disponen, de preferencia, entre las miofibrillas, a nivel de la banda I. En este tipo de fibras la línea Z es mas delgada que en las fibras rojas.

C) Las fibras intermedias presentan características intermedias entre las otras 2 variedades de fibras, pero superficialmente se asemejan más a las fibras rojas y son mas abundantes en los músculos rojos. Poseen un número de mitocondrias equivalente al de las fibras rojas, pero su línea Z es delgada como en las fibras blancas (Larios Escalante A, 1998).

CLASIFICACIÓN DE LAS FIBRAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO POR SU VELOCIDAD DE CONTRACCIÓN.

El tejido muscular tiene la plasticidad para adaptarse a los requerimientos de su actividad y al contenido en el aporte de sustratos (estado nutricional) (Adrian, R.H, 1969). Las propiedades adaptativas del músculo han permitido establecer una clasificación de los tipos de fibras. En el músculo esquelético las fibras se clasifican en dos;

a) **de contracción lenta (Tipo I)**, que son fibras musculares que tienen un metabolismo aeróbico y por consiguiente tienen una gran cantidad de mioglobina y mitocondrias y la capacidad de mantener su contracción por periodos mas prolongados, este es el caso de los músculos posturales

b) **de contracción rápida (tipo IIB)**, que son aquellas que requieren de una rápida explosión de fuerza y cuya característica principal va a ser una contracción rápida y fuerte, este tipo de fibras dependen principalmente del metabolismo anaerobio o glucolítico; y por consiguiente, la curva de tensión tiempo es demasiado limitada, a este tipo de músculos se les llama también, músculo blanco, siendo estas fibras son más susceptibles a la fatiga.

Existen fibras musculares que poseen características intermedias entre las dos mencionadas anteriormente, a estas se le denomina Tipo II A y Tipo XX, cuyas características predominantes estarán dadas por las demandas ambientales (Figura 9).

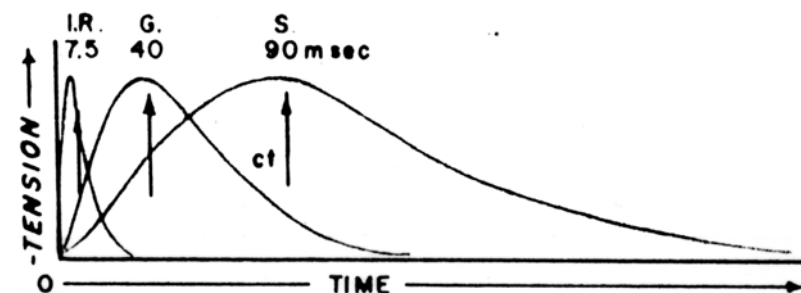


Figura 9. Sacudida Simple en los tres diferentes tipos de músculo.

Tipos de Fibras

1. Lentas o resistentes a la Fatiga (oxidativas)

IIA. Intermedias (oxidativas-glucolíticas)

IIIX. Intermedias (glucolíticas-oxidativas)

IIB. Rápidas o no resistentes a la Fatiga (glucolíticas)

Características metabólicas de los tipos de fibras musculares

Fibras Lentas (rojas):

- ❖ Metabolismo oxidativo.
- ❖ Resistencia a la fatiga.
- ❖ Mayor cantidad de mitocondrias
- ❖ Mayor concentración de mioglobina.
- ❖ Función postural

Fibras Rápidas (blancas):

- ❖ Metabolismo glucolítico.
- ❖ Mínima resistencia a la fatiga.
- ❖ Menor cantidad de mitocondrias.
- ❖ Menor concentración de mioglobina.
- ❖ Función de movimiento

MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN (TEORÍA DEL DESLIZAMIENTO)

Excitación y Contracción: se puede explicar por una secuencia de eventos que se resumen de la siguiente manera: 1) La Neurona Motora transmite el impulso eléctrico a la fibra muscular a través de la unión neuromuscular, en donde se realiza una sinapsis con la liberación de los neurotransmisores. 2) El potencial de acción se traslada a lo largo de los tubulos transversos al interior de la fibra y los *receptores de Dihidropiridina*, acoplados a los canales lentos de calcio, se comunican con el *receptor de Rianodina* presente en la cara de unión de las *Cisternas del Retículo Sarcoplasmico* y se libera masivamente calcio del RS. 3) El calcio liberado se une a la *Troponina*, liberando a la *Tropomiosina* de su sitio de unión con la *Actina*, estando libre la *Actina*, puede interactuar con la *Miosina* y se realizan los puentes cruzados. 4) Se utiliza ATP para la activación de la *Actina*, sin embargo, la hidrólisis del ATP ocurre cuando los puentes cruzados se liberan (Figura 10) (William F. Ganong, 2000).

Relajación Muscular:

El retículo sarcoplásmico a través de la bomba calcio lleva al calcio del espacio citoplásmico al interior del RS en contra de un gradiente de concentración, lo que requiere el gasto de ATP, por dos calcio transportados al interior del retículo sarcoplásmico durante la relajación, se hidroliza un

ATP. Por lo tanto, una vez que el calcio deja el citoplasma, se une a la troponina y esta a la tropomiosina, bloqueando nuevamente a la Actina en su interacción con la Miosina. Este ciclo se muestra en la Figura 10.

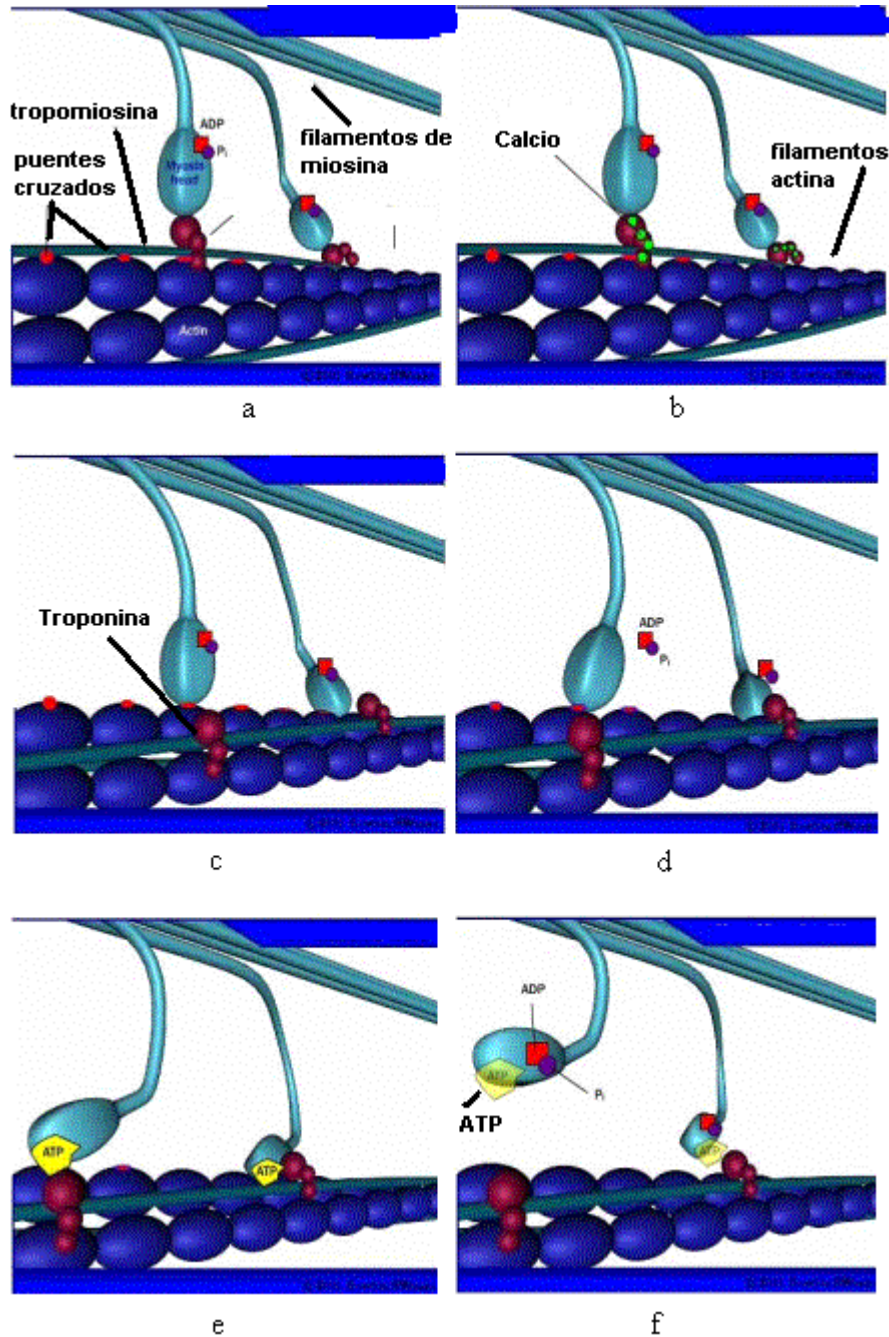


Figura 10. Representación esquemática del mecanismo de interacción de la actina con la miosina para que se lleve a cabo el deslizamiento de proteína que resulta en la contracción muscular. (a) Estado de reposo, la tropomiosina esta unida a la actina, (b) el calcio se une a la troponina y libera a la tropomiosina de su interacción con la actina, (c) la actina se une a la miosina, (d) se une ATP a las cabeza de miosina, (e) la cabeza de miosina experimenta un ángulo y desplaza a la actina y (f) se hidroliza el ATP y la cabeza de miosina se libera, para iniciar un nuevo ciclo.

IRRIGACIÓN E INERVACIÓN MUSCULAR.

Los músculos tienen una abundante provisión de sangre, los nervios de los músculos son de función motora, sensorial y vasomotora. El número de fibras musculares inervadas por una fibra nerviosa varía y guarda relación con la finura del movimiento requerido. En los músculos lisos oculares hay una fibra nerviosa por cada fibra muscular, en cambio en el tronco y miembros una fibra nerviosa puede inervar 100 o más fibras musculares (Larios Escalante, 1998).

La inervación tiene mucha importancia fisiológica debido a que la fibra muscular no puede contraerse a diferentes grados de intensidad; se contrae por completo a su capacidad máxima, o no lo hace en absoluto; a esto se le denomina **la ley del “todo o nada”**. Así, la fuerza de contracción de un músculo depende del número de fibras que se contraen, y no del grado de contracciones de cada una. Se sabe que los músculos aumentan de tamaño con el ejercicio, lo cual proviene del aumento de tamaño de cada fibra muscular individual (hipertrofia) y no del aumento del número de fibras (hiperplasia).

DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO DISTROFINA-GLICOPROTEINA (DGP) EN MÚSCULO ESQUELETICO.

El DGP esta conformado por un grupo de proteínas membranales, periféricas e integrales que proporcionan un vinculo estructural entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de la células musculares (Ervasti y Campbell 1993) (Figura 11). Este complejo se encuentra localizado en el sarcolema y las proteínas que lo conforman se organizan estructuralmente en 3 subcomplejos distintos: (a) la familia de las distrofinas y otras proteínas citoesqueleticas asociadas; *distrofina/utrofina/DRP2*, *distrobrevinas* (subunidades α y β) y *sintrofinas* (subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$), (b) los *distroglicanos* (DGs: subunidades α y β) y (c) el *subcomplejo sarcoglicano –sarcospan* (SGs: subunidades α, δ, ξ y β y *sarcospan*: SSPN) (Hack et al. 2000).

N-terminal; las 4 restantes Dp 260, Dp 140, DP116 y Dp 71 (designadas de acuerdo a su peso molecular), son producto de una transcripción regulada por promotores localizados dentro de intrones del gen de la misma distrofina. Consecuentemente, estas isoformas comparten un mismo dominio C-terminal. Se ha observado que estas isoformas presentan una expresión diferencial, en algunos tejidos, Dp-260 se expresa principalmente en la retina (Pillers et al 1993) la expresión de Dp140 se encuentra restringida al sistema nervioso central y a los riñones (Lidov et al 1997); Dp116 se expresa en los nervios periféricos y Dp71 si bien es una proteína ubicua se expresa en altos niveles en el cerebro, el pulmón, el hígado, y el riñón (Rando 2001). Otros de los miembros de las familias de las distrofinas son la utrofina cuya expresión a diferencia de la distrofina es ubicua, y la DRP2 que se expresa en una variedad de tejidos como el cerebro, el epidídimo, los riñones y los ovarios (Pillers et al 1993).

Otras proteínas del citoesqueleto asociadas al complejo DGP son la sintrofina y la distrobrevinas. Las sintrofinas se unen a la segunda mitad de la región C-terminal de la distrofina, especialmente la α 1-sintrofina interacciona con los aminoácidos en las posiciones 3444-3494 (exón 73) (Suzuki et al 1995) y la β 1-sintrofina se une a los 53 aminoácidos correspondientes al exón 74. Por otro lado las distrobrevinas son consideradas de manera separada, ya que además de ser proteínas separadas a la distrofina (DAPs) como las sintrofinas son proteínas relacionadas a la distrofina (DRPs) (Daniel Jung et al 1995), que contiene sitios de unión a sintrofinas por lo que puede asociarse de manera alterna con distintas DRPs (Peters et al 1997).

b) Distroglicanos.

Los distroglicanos conforman un subcomplejo de proteínas sintetizadas a partir de un solo gen, al transcrito de este gen codifica para un solo polipéptido de 97kDa que es dividido postraduccionalmente en α - y β -distroglicanos (DG) (Ibraghimov-Beskrovnaya et al 1992, Holt et al 2000). En el músculo esquelético las formas maduras de α - y β -DG (156 kDa y 46 kDa, respectivamente) forman un complejo ubicado en la membrana celular que se asocia fuertemente con la distrofina (Ibraghimov-Beskrovnaya et al 1992). El β -Distroglicano atraviesa la membrana mediante un solo dominio transmembranal y el α -Distroglicano se une a la porción extracelular del β -DG (Henry y Campbell 1998), además se ha observado que en el músculo esquelético la región C-terminal del β -DG se une intracelularmente a la región rica en cisteínas de la distrofina o utrofina (Jung et al 1995). Los distroglicanos se expresan en varios tipos celulares incluyendo células epiteliales (Durbeej et al 1995) y neuronas (Tian et al 1996).

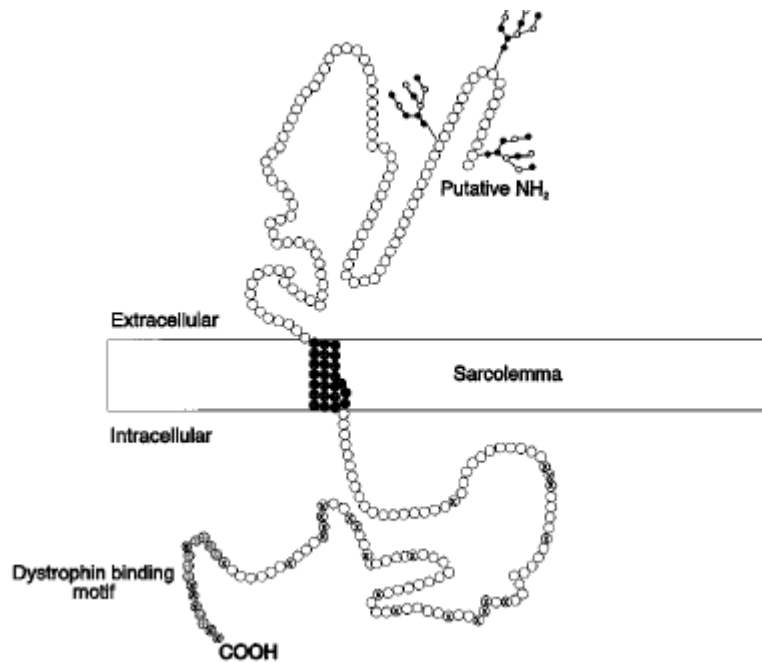


Figura 12. Estructura esquemática de β -distroglicano. Cada aminoácido es representado por un círculo. El aminoácido supuesto del N-terminal, correspondiendo al sitio de la hendidura del precursor distroglicano

c) sarcoglicanos

El complejo sarcoglicano está formado por α , β , γ , δ (alfa, beta, gamma y delta) sarcoglicano, una nueva nomenclatura que corresponde a: α (A2/50DAG o adhalina), β (A3b/43 DAG), γ (A4/35DAG); su función no es bien conocida (Ozawa y cols, 1998). cuyo gen se localiza en 7q21, aunque hasta ahora no está implicado en la producción de ningún tipo de distrofia muscular (Colomer, 1999). La patología de este complejo (sarcoglicanopatías) (Noguchi y cols, 1995) origina cuadros con muy amplio espectro clínico.

JUSTIFICACIÓN

Desde el punto de vista del conocimiento básico, el entendimiento de la constitución de las membranas biológicas y su participación no solo como barrera en la comunicación del medio extra e intracelular o soporte de la actividad de proteínas, sino como una entidad activa con la posibilidad de formar sub-dominios dentro de su misma estructura que regulan la actividad de las proteínas membranales y proteínas asociada a las membranas. La sarcolema del músculo esquelético alberga a complejos proteínicos involucrados en señalización y acople de tensión durante el estímulo mecánico, como lo es el complejo distrofina-Distroglicano, por lo que la membrana *per se* regula en el acople excitación contracción, la transmisión de fuerza lateral y longitudinal en la fibra muscular.

El entendimiento de la comunicación de las proteínas del músculo esquelético de manera longitudinal nos permitirá entender como se acopla el músculo durante la contracción la cual tiene como consecuencia una deformación de la fibra durante el acortamiento, por lo que las proteínas contráctiles deben permanecer conectadas con la membrana plasmática Sarcolema (SL) y ésta a su vez esta unida a la Matriz Extracelular (ME) a fin de que el movimiento se transmita de manera simultanea a las fibras contiguas y se origine la fuerza sumatoria durante la actividad muscular.

Por otro lado, es importante ubicar la distribución de los esfingolípidos (GM1) en la fibra muscular viva, ya que se ha determinado una cantidad aumentada de los mismos en Túbulos transversos aislados de músculo esquelético rápido y en las regiones de la Sarcolema en donde se encuentran las proteínas del complejo Distroglicano. Esta distribución ha de corresponder con sitios membranales que regulen la actividad de señalización intracelular ya sea para la presentación de proteínas intracelulares en las membranas, o activación de factores de transcripción o para la activación de las proteínas que comunican el citoesqueleto con la matriz extracelular a través del complejo distrofina-distroglicano.

HIPOTESIS

La distribución regular de las proteínas que constituyen el complejo-DGP a lo largo de la fibra, siguen una distribución sarcomérica, sugiriendo la existencia de regiones específicas en la sarcolema (subdominios lipídicos) que albergan a éste complejo, entre estas regiones podemos mencionar a GM1, a través del cual se comunican las proteínas del citoesqueleto con las proteínas de la matriz extracelular participando así en la transmisión de fuerza transversal durante la contracción. Por lo que la localización de las proteínas marcadoras del complejo DGP, identificadas por Microscopía confocal en la misma región, indicará que durante el proceso de contracción hay una comunicación entre las proteínas del citoesqueleto-complejo DGP-laminina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Localizar por Microscopía confocal la distribución de las proteínas del complejo-DGP y proteínas costaméricas asociadas, presentes en el citoplasma y en el espacio extracelular en una célula muscular viva aislada de músculo esquelético rápido.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar una fibra o grupos de fibras vivas por disección, a partir del músculo ***Extensor Digitorum Longus*** de una rata adulta, por microscopía de luz en campo oscuro.
2. Determinar la viabilidad de la fibra por medio de estimulaciones eléctricas.
3. Determinar las Condiciones para permeabilizar a la fibra muscular e incorporar los anticuerpos marcadores por Microscopía Confocal:
 - a) Determinar la presencia de Laminina en la matriz extracelular en un grupo de fibras.
 - b) Determinar la localización de la proteína α y β -destroglicano.
 - c) Determinar la presencia de las proteínas del citoesqueleto: distrofina y α -actina.
 - d) Determinar la presencia de Caveolina-3
 - e) Determinar la localización de GM1
4. Establecer las condiciones para observar a la fibra muscular por Microscopia Confocal.

MATERIAL Y METODO

MANEJO DE ANIMALES

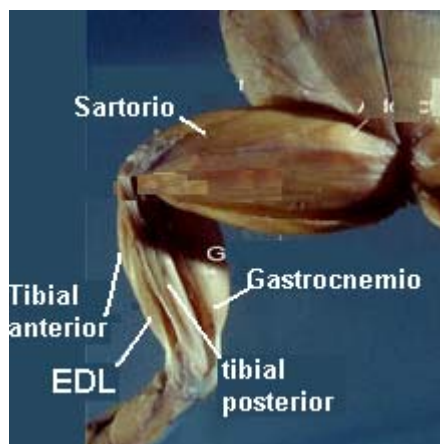
Se utilizaron ratas macho de la cepa wistar (Fig. 13) de peso entre 280-300g. Se sacrificaron con cloroformo, para iniciar la disección del músculo *extensor digitorum longus* (EDL)



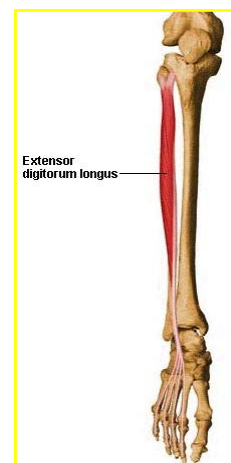
FIG. 13. Rata macho de la cepa wistar.

DISECCION DEL MUSCULO EDL.

El músculo EDL tiene la función de extender los dedos del pie en el humano y de las patas posteriores en los roedores, a excepción del dedo gordo. El EDL tiene su origen en el extremo proximal de la tibia y el peroné y la membrana ínterósea. El EDL pasa por debajo de la retináculo del extensor de la región del tobillo y entra en el dorso del pie como cuatro tendones que se insertan en las falanges de la II-V medias y distales por medio de una extensión digital dorsal compleja tanto en los roedores como en el humano (Fig. 14).



A



B

Figura 14. Localización del músculo EDL, (A) en rata, (B) Humano

Para la disección del músculo EDL se colocó a la rata en una tabla especial para fijarla de sus patas (Figura 15A), se localizó el tendón proximal (cercano a la rodilla) se amarró con hilo de sutura y se cortó el tendón para separar al músculo, posteriormente se localizó el tendón inferior que se inserta en el tarso y de igual manera se amarró y se cortó, para separar al músculo completamente (Fig.15B). Los músculos extraídos se colocaron inmediatamente en una cámara de disección que contiene solución de Krebs (mM): NaCl 135, KCl 5, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 15, Na₂HPO₄ 1, Dextrosa 11, CaCl₂ 2.5, pH 7.1 y se burbujea con oxígeno al 95% y Dióxido de carbono al 5%.

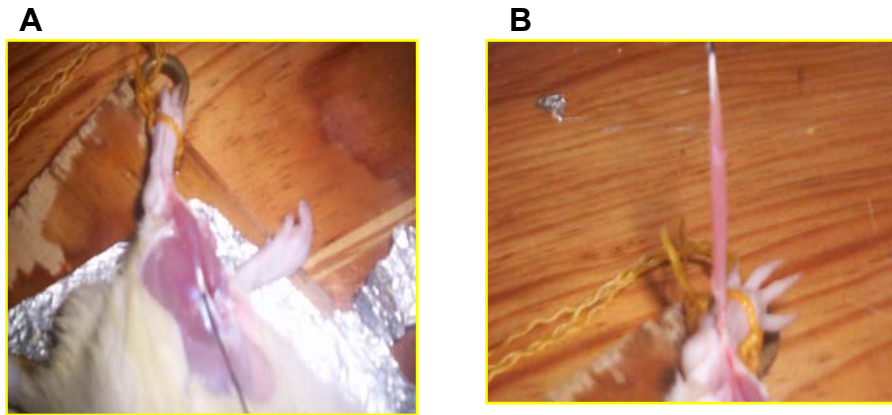


Fig. 15. Extracción del músculo EDL. A) localización en la rata del músculo EDL B) extracción del músculo EDL amarrando los tendones superior e inferior.

DISECCIÓN DE FIBRA ÚNICA

Para la disección de la fibra se utilizó un microscopio (Wild M-8; Heerbrugg, Switzerland) (Fig.16A), tijeras, cuchillos y pinzas para microcirugía (Fig.16B).

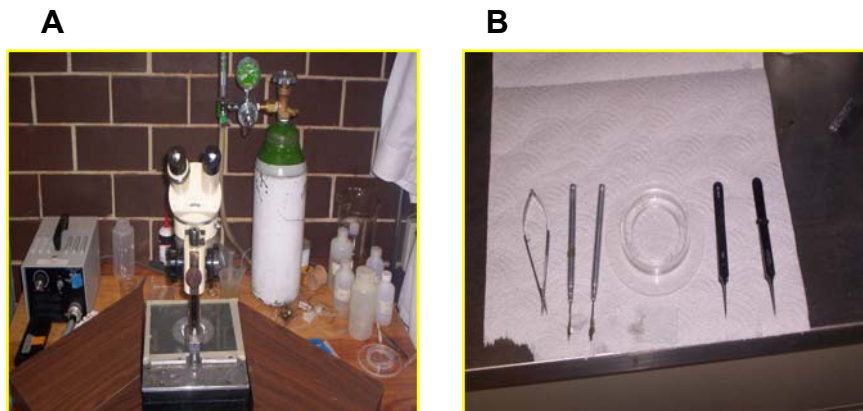


Figura 16. A) microscopio para la disección, B) instrumentos de microcirugía para la disección y la obtención de una sola fibra muscular.

Montado el músculo en la cámara de disección (Fig. 17A) se corta poco a poco con los instrumentos de microcirugía (pinzas y tijeras especiales) llegando a la parte central del músculo (Fig. 17B), se deja reposar la preparación por 5 minutos para permitir que todas las fibras muertas dejen de contraerse ya que la tensión producida en los tendones, provocaría la ruptura de la fibra única. Se continuó el aislamiento con pinzas muy finas y con cuchillos hechos con navajas muy delgadas hasta obtener una sola fibra (Fig. 16C). Toda la disección se llevó acabo con oxigenación constante para mantener al músculo vivo con la mezcla O₂ 95%, CO₂ 5%.

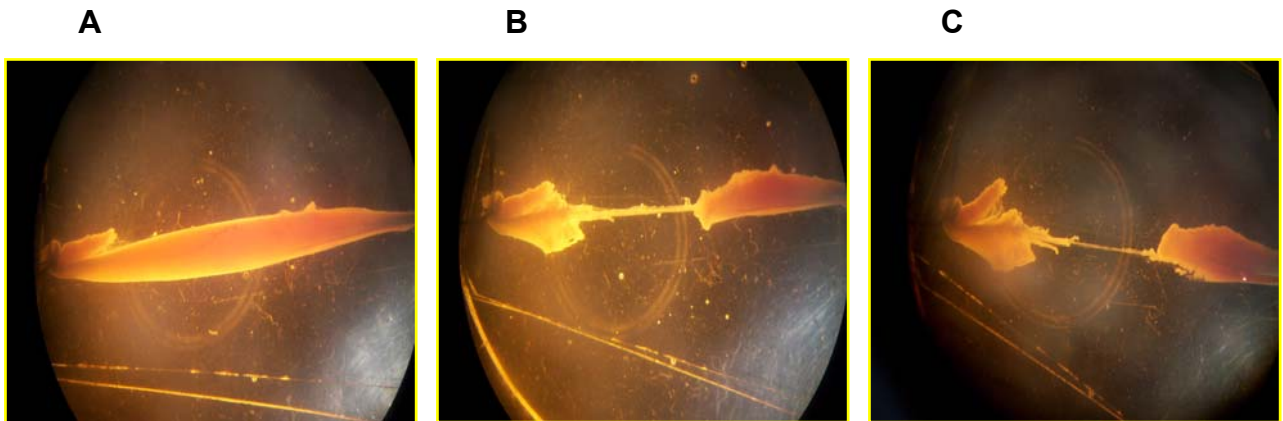


Figura 17. Disección de fibra única del Músculo EDL colocado en la cámara de disección para el aislamiento de la fibra con solución de Krebs y oxigenación. A) Músculo EDL entero, B) mitad de la disección de la fibra, C) fibra única del músculo EDL

CONTRACCIÓN DE LA FIBRA

Una vez aislada la fibra se comprobó que estuviera viva provocando que se contrajera mediante un estímulo de 5V a través de un electrodo de platino (Fig.18 B y C) conectado a un Estimulador Grass SD9 (Fig. 18A).

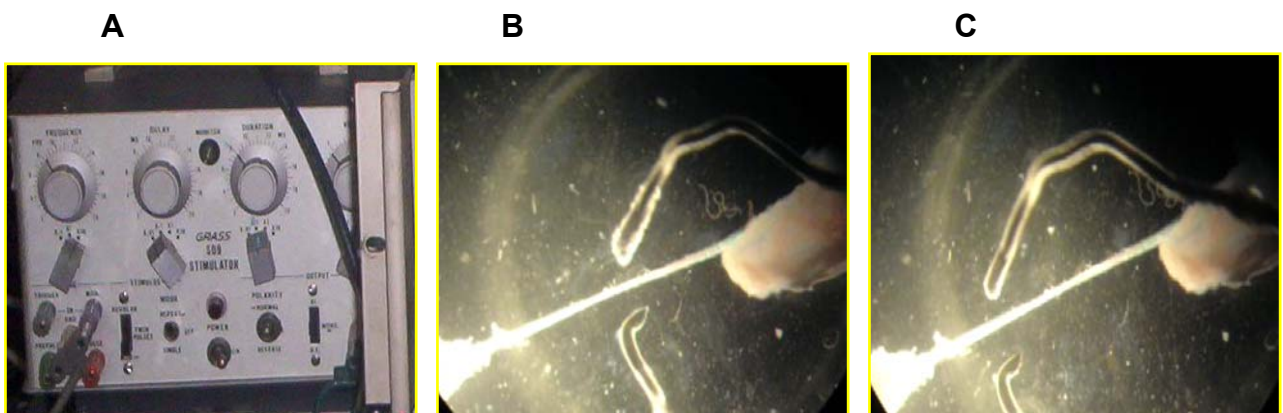


Figura18. Comprobación de la viabilidad de la fibra mediante estímulos eléctricos. A) estimulador para producir estímulos eléctricos para comprobar que la fibra estuviera viva. B y C) demuestran la fibra mediante la contracción con los estímulos producidos por los electrodos de platino.

Después de la estimulación se introdujo la fibra en una solución de permeabilidad para permitir la entrada de los anticuerpos marcadores de las proteínas que se desean localizar.

MARCAJE DE PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DGP EN LA FIBRA

Para localizar la distribución de las proteínas del complejo DGP se permeabilizó la sarcolema utilizando el siguiente procedimiento:

Se colocó la fibra en cuatro soluciones de permeabilidad cuyas concentraciones se muestran en las Tablas 2 y 3. En la solución 1 se colocó por 5 minutos, en la solución 2 por 10 minutos, en las soluciones 3 y 4, por 10 minutos. Entre cada solución se lavo con PBS durante 5 minutos cada vez. Los tiempos se determinaron en base a las condiciones que requirieron las proteínas para que entraran a la fibra muscular.

Para α -dístroglicano y laminina, proteínas que no requerían de permeabilización se colocó directamente en solución de Krebs el anticuerpo primario, se lavó posteriormente con PBS durante 5 minutos, al final se colocó el anticuerpo primario con el anticuerpo secundario marcado con fluorocromo (alexa 488 y alexa 405 respectivamente) por 15 minutos, de ahí las muestras se pasan directo al microscopio confocal para obtener las imágenes necesarias y localizar su distribución en la fibra muscular.

Tabla 2. Soluciones de permeabilidad

SOLUCION 1		SOLUCION 2	
EGTA	10mM	Proteína (anticuerpo primario)	10 μ M
Metanosulfonato	120mM	Metanosulfonato	120mM
ATP	5mM	ATP	5mM
Mg ₂ SO ₄	2mM	Mg ₂ SO ₄	2mM
MOPS	20mM	MOPS	20mM
pH 6.8			

Tabla 3. Soluciones de permeabilidad

SOLUCION 3		SOLUCION 4	
Proteína (anticuerpo primario) + fluorocromo	10 μ M	Proteína (anticuerpo primario) + fluorocromo	10 μ M
Metanosulfonato	120 mM	Metanosulfonato	5 mM
ATP	5 mM	NaSO ₄	140 mM
Mg ₂ SO ₄	2 mM	Mg ₂ SO ₄	10 mM
MOPS	20 mM	MOPS	2 mM
		Glucosa	5.6 mM
pH 6.8		pH7.1	

ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados para encontrar la distribución de las proteínas son los siguientes:

- **Laminina:** policlonal anti-laminina de conejo, dilución 1: 50
- **beta-distriglicano:** anticuerpo monoclonal de ratón dilución, 1:500
- **alfa-distroglicano:** anticuerpo monoclonal de ratón dilución, 1:500
- **Distrofina:** anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1: 250
- **actina:** anticuerpo monoclonal anti- α -sarcómero actina, de ratón dilución 1:5000
- **caveolina:** anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1:1000
- los anticuerpos secundarios (fluorocromos) utilizados para el marcaje de las proteínas fueron el alexa 405, 488 y 633 (los dos primeros anticuerpos de ratón y el ultimo anticuerpo de conejo).

MICROSCOPIO CONFOCAL

El microscopio confocal utilizado esta adaptado con un sistema computarizado para la adquisición de imágenes en tercera dimensión. Se basa en un principio similar al de un microscopio de fluorescencia, pero se utilizan dos diafragmas confocales (uno antes de la muestra y otro después) capaces de enfocar la iluminación en un único punto de la muestra. Se utiliza un láser como fuente luminosa, y con él se va barriendo la muestra por todo su volumen, plano a plano, creando muchas imágenes bidimensionales que un software interpreta, generando finalmente una imagen tridimensional del objeto (Lichtman J. 1994). (Fig.19).

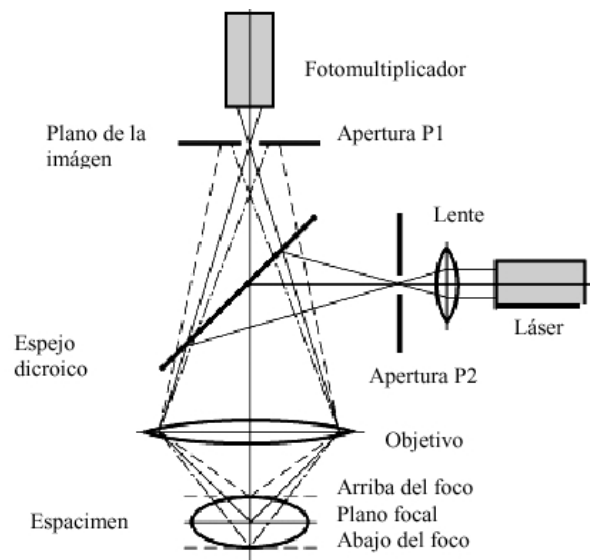


Figura 19. Diagrama de los componentes fundamentales de un Microscopio confocal

COMPONENTES

Fuente luminosa: Luz amplificada por emisión estimulada de radiación.

Espejo dicroico: Refleja totalmente la luz que incide con un ángulo de cerca de 45° . es la propiedad de presentar de manera alternativa dos coloraciones según la dirección de los rayos de luz incidentes.

Ranura detectora Pinhole: Esta ranura sólo permite el paso de la luz reflejada por el plano focal.

Lente objetivo: Permite enfocar el rayo de luz reflejado por el espejo dicroico hacia el plano focal de la muestra.

Detector: Recibe el haz de luz y genera una imagen.

Láser: es un dispositivo que utiliza un efecto de la mecánica cuántica, la emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz coherente de un medio adecuado y con el tamaño, la forma y la pureza controlados.

El microscopio utilizado para la obtención de imágenes confocales fue el **Espectral FV1000 Olympus** (Fig. 20). Las muestras se excitan utilizando un láser Ar-Kr con rayos y filtros apropiados para los anticuerpos fluorescentes. Usando objetivos de 10X, 20X, 60X y 100X, **Sistema de excitación:** Diodo violeta 405nm (6mW). Argón multilínea: 457nm, 488nm i 515nm (40mW). Diodo verde 561nm (10mW) Helio-neón rojo 633nm (10mW)

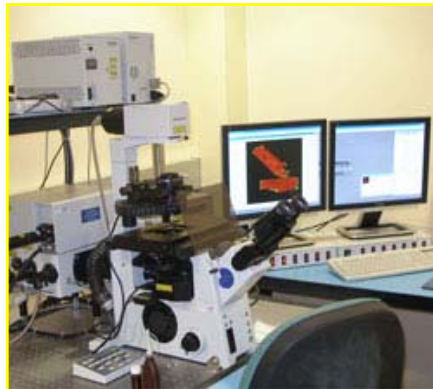


Figura 20. Microscopio confocal FV1000 Olympus

Determinación de la longitud de los espacios sarcomericos.

Para la medición de los espacios sarcomericos de los patrones de todas las fibras se utilizó el mismo programa con el que se manipularon las imágenes, los valores del programa los da mil veces más grandes de lo real. Para obtener el valor real solo se dividió entre mil la mediada que daba el programa.

RESULTADOS

Para la localización de las proteínas del complejo DGP en la fibra muscular del músculo esquelético se hizo primero un control sin anticuerpo primario (proteína) ni anticuerpo secundario (fluorocromo) para determinar como se presenta una imagen en microscopia confocal sin los anticuerpos. En la Fig.21 se muestran las imágenes obtenidas del microscopio confocal en las condiciones antes mencionadas. La imagen fue obtenida a un objetivo de 60x y un acercamiento de 10X. Las imágenes fueron obtenidas sin después de la disección no se colocó anticuerpos.

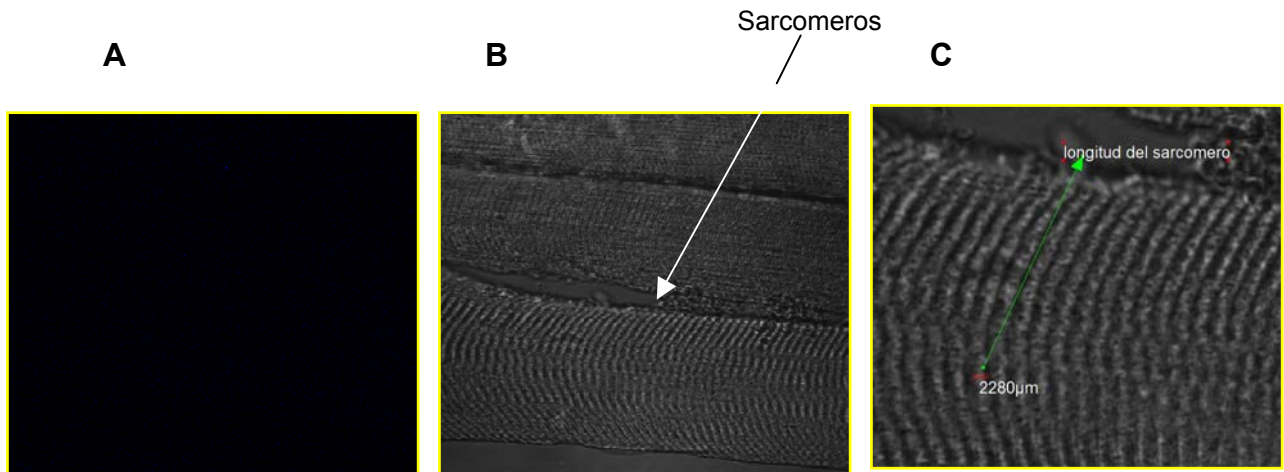


Figura 21. Control del músculo EDL sin fluorocromo ni anticuerpo primario el valor real del patrón sarcómero está dado entre 1000. A) Imagen de microscopia confocal donde no se muestra fluorescencia, B) imagen de tres fibras musculares donde se observan los sarcòmeros. C) longitud del sarcòmero.

La figura 21B se muestra una fibra muscular al microscopio confocal donde observamos que está compuesta de varias unidades contráctiles que reciben el nombre de sarcómero. Varios sarcómeros dispuestos en serie forman una miofibrilla, varias miofibrillas dispuestas en paralelo forman una fibra, en la imagen 21A se muestra que no presentan fluorescencia si no se le agregan los anticuerpos necesarios para localizar la distribución de las proteínas. Estas imágenes fueron tomadas inmediatamente después de la disección de la fibra. En la figura 21C se observa cual es la longitud de un sarcòmero la cual equivale a 2.69µm.

LOCALIZACIÓN DE α y β DISTROGLICANOS.

Para la localización de los distroglicanos se realizaron los experimentos con permeabilización de las fibras y sin permeabilización, como estudios previos han localizado a la subunidad α en la cara extracelular de la Sarcolema (Ibraghimov-Beskrovnya et al 1992). Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal demuestran que con permeabilización, aplicando directamente el anticuerpo, no se observa patrón sarcòmero (Fig.22B), la imagen con fluorescencia (Fig.22A) revela que el alfa-distroglicano se encuentra distribuido a lo largo de la Sarcolema en toda la fibra muscular. La imagen en tercera dimensión (Fig. 22C) demuestra que el α -DG solo se encuentra en la sarcolema y que no penetra

al citoplasma aún cuando la fibra sea permeabilizada. Las imágenes fueron obtenidas con un acercamiento de 20x y un objetivo de 100x. En el caso de la aplicación del α -DG a la fibra sin permeabilizar muestra el mismo patrón que las imágenes focales con permeabilización, lo que cambia es la intensidad de la imagen focal ya que en las imágenes sin permeabilizar se observan más intensas. Las imágenes 22D-2F fueron obtenidas con un acercamiento de 20x y un objetivo de 100x. La Figura 22D señala que el anticuerpo para α -DG se localiza en toda la fibra muscular, en la figura 22E muestra la fibra sin que esté prendido el láser para el alexa 488 solo se observa la fibra completa ya que no se observa el patrón sarcómero en ella, y la figura 22F revela que el α -DG se localiza únicamente en el espacio extracelular, y nunca entra al citosol observándose perfectamente su localización en el perímetro exterior de la fibra. El anticuerpo para α -DG se marcó con un anticuerpo secundario denominado alexa 488 el cual utiliza el láser de argón para que emita la luz y detecte la fluorescencia.

α -DISTROGLICANOS

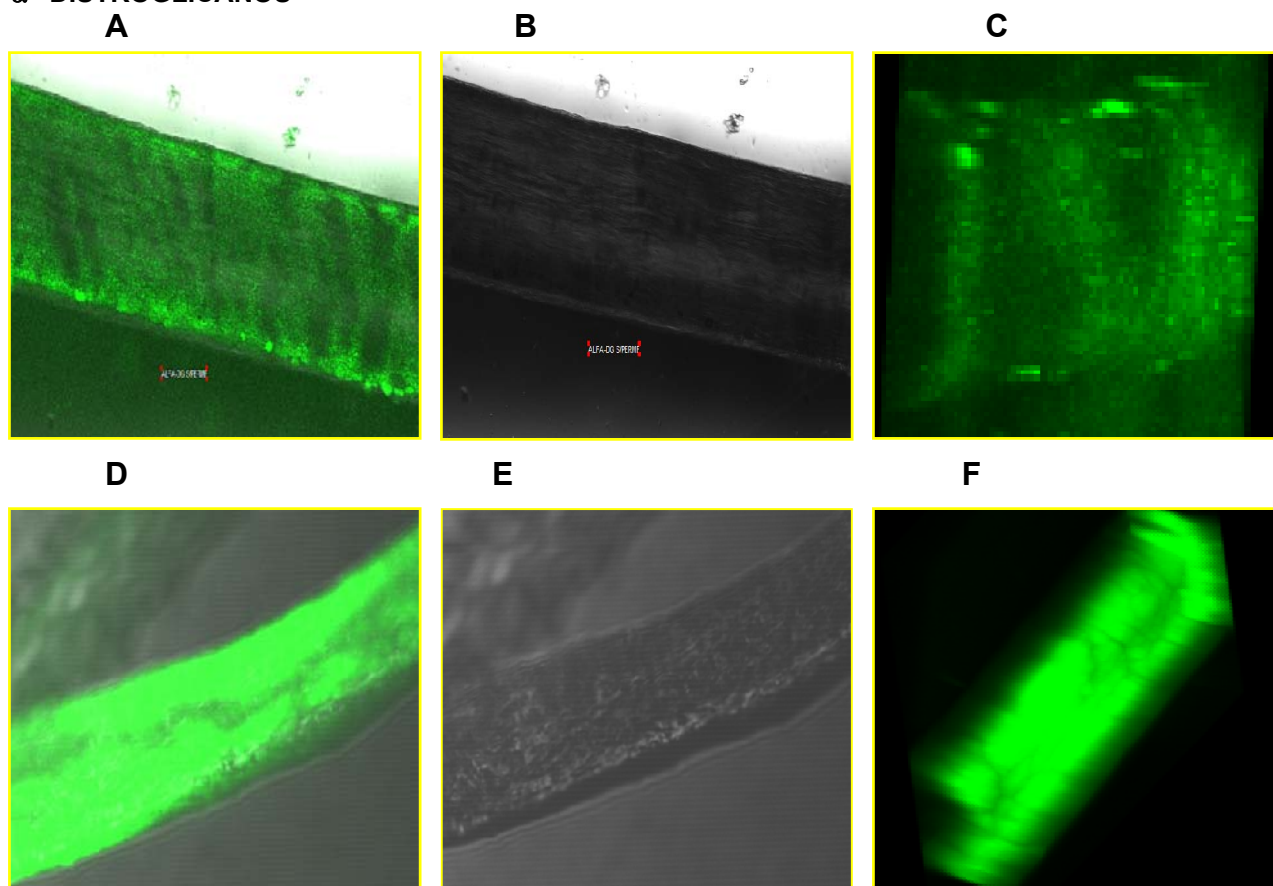


Figura 22. Localización de α -DG en una fibra muscular aislada. Se observa la fibra única fibra muscular para el anticuerpo de α -DG permeabilizando y sin permeabilizar. A) α -DG permeabilizando con anticuerpo **alfa-distroglicano**: anticuerpo monoclonal de ratón dilución, 1:500, B) Control α -DG permeabilizando, C) Imagen 3D α -DG permeabilizando, D) α -DG sin permeabilizar, E) Control α -DG sin permeabilizar, F) Imagen 3D α -DG sin permeabilizar.

β -DISTROGLICANO

Se localizó el β -DG en dos fibras musculares esqueléticas (Fig. 23B) permeabilizando la célula para ver su distribución en el interior de la misma. Las imágenes confocales obtenidas para el β -DG, demuestran su distribución en la parte interna de la Sarcolema, en ambas fibras musculares (Fig. 23A), donde se puede observar que la localización de β -DG en una imagen en 3D (Fig. 23C) no toca la matriz extracelular, pero tampoco se extiende en el citoplasma únicamente se encuentra en la membrana.

Para marcar se utiliza el anticuerpo primario para β -DG y el fluorocromo de alexa 405 y así poder observar las imágenes confocales. Como se observa en la figura 23 el β -DG no toca o sale hacia la matriz extracelular únicamente se localiza en la región citosólica de la Sarcolema. En las imágenes obtenidas como control se observa perfectamente el patrón sarcómero, situación que no se observa con el α -DG. Las imágenes fueron obtenidas con un acercamiento de 10x y un objetivo de 60x, la longitud que presenta el patrón sarcómero es de 2.28 μm . En la figura 23B se observan las dos fibras donde se colocó el anticuerpo primario para β -DG en ambas se presenta el patrón sarcómero, en la figura 23A se observa que el anticuerpo para β -DG marcado con alexa 405 (anticuerpo secundario) la distribución del β -DG esta exclusivamente en la cara citosólica de la Sarcolema, también esta imagen revela que el β -DG se encuentra distribuido con un patrón sarcómero. En la figura 23C se presenta una imagen en donde se muestra la localización del β -DG en el interior de la fibra, ya que nunca toca la matriz extracelular en ninguna de las fibras.

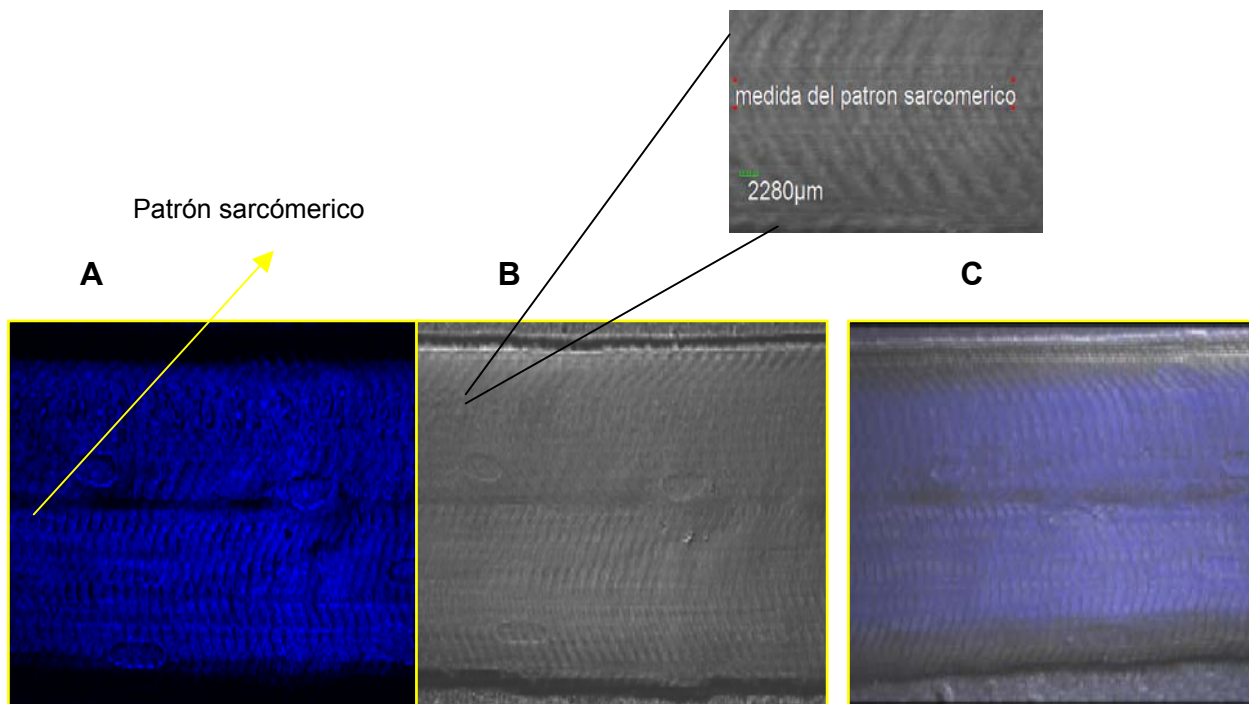


Figura 23: Localización del β -DG en dos fibras musculares con anticuerpo **beta-distriglicano**: anticuerpo monoclonal de ratón dilución, 1:500. Las determinaciones de la longitud de los espacios sarcomericos esta dada en $\mu\text{m}/1000$. (A) β -DG en fibra permeabilizada, B) Control β -DG en fibra permeabilizada, C) Imagen 3D β -DG en fibra permeabilizando.

DISTROFINA

La Distrofina es una proteína de distribución subsarcolemal. Al parecer su papel principal es el de conectar a los filamentos de actina con las proteínas de la membrana celular, los distroglicanos. La localización de la distrofina en imágenes confocales revelan que esta se encuentra en el patrón sarcómero en toda la fibra muscular en la Figura 24.

La distrofina se localiza en las fibras musculares en la pared interna de la membrana del sarcolema, el patrón de distribución para la distrofina en la fibra muscular se observa en la figura 24A. Se observa que no toca la matriz extracelular y tiene un patrón sarcómero. El anticuerpo secundario con el que se marco la proteína fue el alexa 633, las imágenes fueron obtenidas con un acercamiento de 10x y un objetivo de 60x.

La figura 24B muestra a la fibra muscular donde se colocaron los anticuerpos para localizar la distribución de la distrofina, también se observa el patrón sarcómero donde cada sarcómero mide aproximadamente 2.4 μm , la figura 24C revela que el anticuerpo para distrofina penetra en esta y no se une a componentes de la matriz extracelular, sino que permanece en la región subsarcolemal. A diferencia de lo observado con el α -DG, la imagen es plana, no curva. Para la localización de la distrofina se aplico la técnica de permeabilización para permitir la entrada de el anticuerpo.

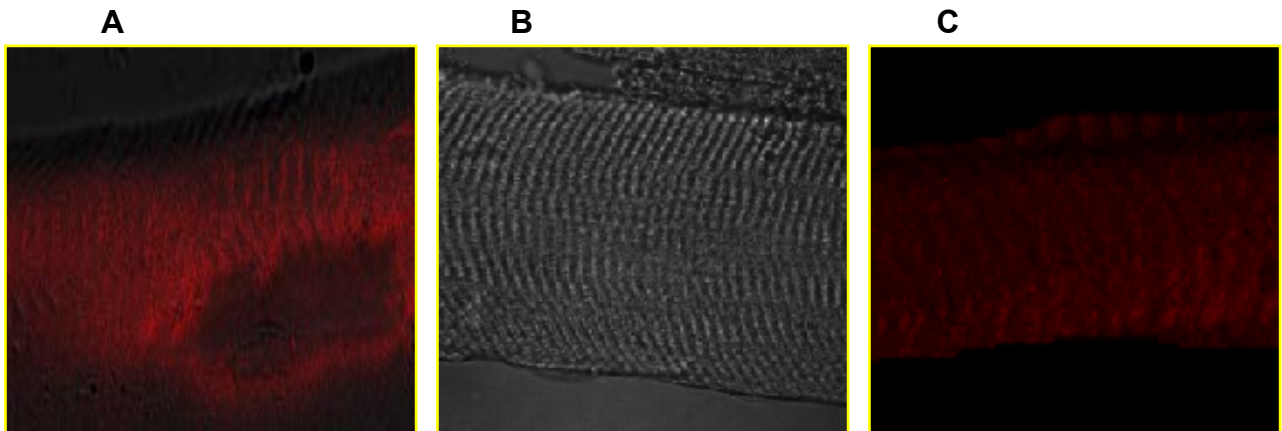


Figura 24. Distribución de distrofina en una fibra muscular con anticuerpo para **Distrofina**: anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1: 250. Se utilizo como anticuerpo secundario al alexa 633. A) distrofina en fibra permeabilizada, B) Control de distrofina en fibra permeabilizada, C) Imagen 3D de distrofina en fibra permeabilizada.

α -ACTINA

La α -actina está muy concentrada en la zona cortical (bajo la membrana) de la fibra muscular, para la localización de la distribución de la actina se empleó el anticuerpo secundario alexa 405. Puede

encontrarse en forma libre o polimerizarse en microfilamentos, que son esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula o durante la división celular.

Para obtener las imágenes confocales se permeabilizó la fibra como se describió anteriormente, las imágenes revelan la distribución de actina en la fibra muscular donde solo se localiza en el citosol en la parte central de la fibra. En la Figura 25B se observa la fibra muscular sin fluorescencia tomándola como control para el patrón sarcómero que mide $2.1\ \mu\text{m}$, las imágenes fueron tomadas con un acercamiento de 60x y un objetivo de 10x. La imagen en la Figura 25A muestra con fluorescencia que la actina se encuentra distribuida en el centro de la fibra y no se observa el patrón sarcómero como en la distrofina.

En la Figura 25C se observa una imagen en 3D de la distribución de la actina donde se observa a la actina principalmente en el citosol, en la parte central, distribuida longitudinalmente paralela al eje de la fibra, no presenta patrón sarcómero y no interactúa con elementos de la matriz extracelular, el anticuerpo para la actina se ubica en un plano, por lo que se decidió permeabilizar a fibra del músculo esquelético.

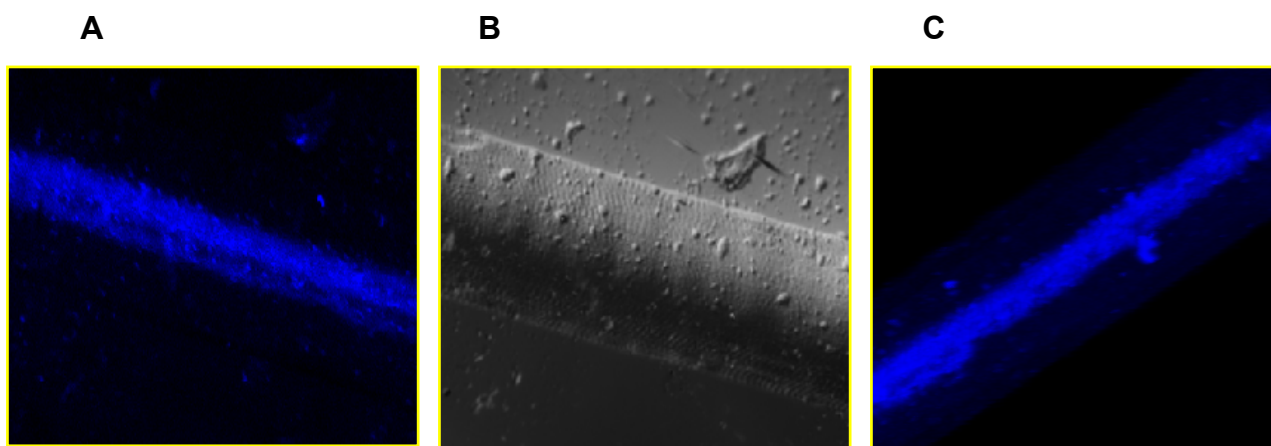


Figura 25. Localización de actina en la fibra de músculo esquelético con anticuerpo actina: anticuerpo monoclonal anti- α -sarcómero actina, de ratón dilución 1:5000 utilizando anticuerpo secundario alexa 405. A) imagen obtenida de microscopia confocal donde demuestra la localización de la actina. B) control de actina permeabilizando la célula. C) imagen en 3D para la ubicación de actina

CAVEOLINA-3

La caveolina-3 se expresa únicamente en el tejido muscular esquelético y esta asociada con la deformación de las membranas para dar origen a invaginaciones conocidas como caveolas. Las caveolinas se encuentran en proximidad con el complejo DGP. La Caveolina-3 interactúa directamente con la región C-Terminal del β -destroglicano (Bonales Alatorre E. 2004). Para la localización de la caveolina-3 en la fibra muscular se necesitó permeabilizar la fibra para localizar la proteína. Las imágenes 26A y 26B fueron obtenidas con un objetivo de 40x y con un acercamiento de 100x donde se observa la longitud de la

imagen confocal de la fibra y su localización dentro de toda la fibra tanto en la Sarcolema como en el sistema de tubulos transversos.

La Figura 26B muestra a la fibra muscular sin fluorescencia tomándola como control para el patrón sarcómero que mide $1.4\ \mu\text{m}$. En la Figura 26A se demuestra que la caveolina-3 se distribuye por toda la fibra muscular. El anticuerpo secundario (fluorocromo) que se utilizó para la localización de la proteína fue el alexa 488, la proteína se localiza tanto en la Sarcolema y a todo lo largo de los Tubulos transversos lo que le da una imagen citosólica. La figura 26C es una imagen 3D de la distribución de la Caveolina y muestra la distribución en el interior de la fibra, por tratarse de una proteína de membrana, la interpretación es que se encuentra en los tubulos transversos, en ambas condiciones, en fibras permeabilizadas como en fibras sin permeabilizar, la Caveolina tiene la misma distribución, lo que nos habla de una distribución en las membranas de superficie (Sarcolema y Tubulos transversos).

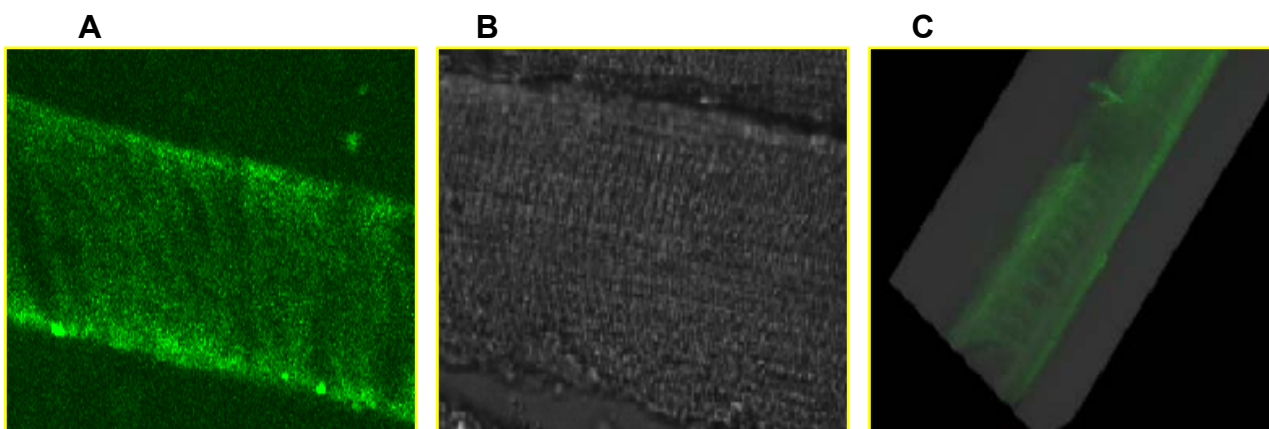


Figura 26. Localización de caveolina-3 en una fibra muscular marcada con **caveolina**: anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1:1000. A) imagen obtenida de microscopia confocal donde demuestra la localización de la caveolina 3. B) control de caveolina-3 permeabilizando la célula. C) imagen en 3D para la ubicación de caveolina-3.

LAMININA

En el caso de la laminina, que se conoce tiene una distribución extracelular, ubicándose entre el una fibra y otra en el tejido conjuntivo subyacente (matriz extracelular). La laminina se localizo entre las fibras, específicamente en el tejido conectivo de une a las fibras musculares una vez en el tejido. Las imágenes confocales obtenidas para la laminina, demuestran su distribución en la matriz extracelular de las fibras musculares (Fig. 27A) principalmente se localizo a la laminina en el tejido conectivo que une a dos fibras. El patrón se sigue cada que termina una fibra y empieza la otra. En La Figura 27B muestra un grupo de fibras sin permeabilizar en donde se observa el patrón sarcómero con una longitud de $2.28\ \mu\text{m}$.

Para marcar a la laminina se utilizó el anticuerpo primario y el fluorocromo de alexa 405 como secundario y así poder observar las imágenes confocales. Como se observa en la figura 27A, la laminina se localiza en el tejido conectivo, en las imágenes obtenidas como control 27B se observa perfectamente

el patrón sarcómero de todas las fibras. Las imágenes fueron obtenidas con un acercamiento de 10x y un objetivo de 60x.

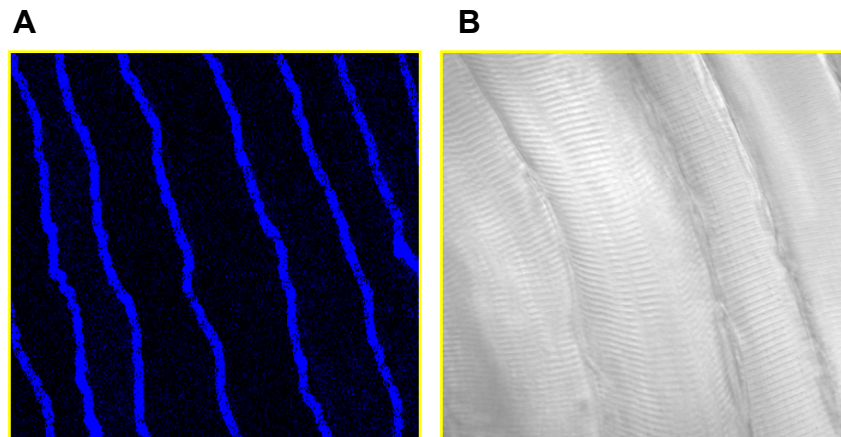


Figura 27. Distribución de laminina en varias fibras musculares marcadas con anticuerpo Laminina: policlonal anti-laminina de conejo, dilución 1: 50. A) imagen confocal donde la laminina se localiza en el tejido conectivo de cada fibra. B) control de varias fibras para la localización de la distribución de laminina.

GM1

El GM1 es un glucoesfingolipido que se encuentra formando parte de las membranas externas celulares, tiene la peculiaridad de asociarse con el colesterol y de ésta forma excluirse en dominios membranales que están enriquecidos en GM1 y colesterol, esto permite a la membrana que los contiene, aumentar su grosor. La importancia de estas regiones membranales enriquecidas en colesterol es que también permiten la partición de proteínas membranales específicas, que no participan de manera funcional en membranas más delgadas, esto es que no contengan colesterol. La Figura 28 muestra el patrón de distribución del GM1 en la fibra muscular aislada.

Para marcar al GM1 se utilizó el anticuerpo primario y el fluorocromo de alexa 633 como secundario y así poder observar las imágenes confocales. Como se observa en la figura 28A, el GM1 se localiza a lo largo de la Sarcolema y en el interior de la fibra, en los tubulos transversos. En La Figura 28B, se muestra la fibra sin permeabilizar, obtenidas como control en donde se observa el patrón sarcómero con una longitud de 2.6 μm .

La Figura 27C se observa la imagen 3D de la distribución membranal del GM1 a lo largo de la fibra. Las imágenes fueron obtenidas con un acercamiento de 10x y un objetivo de 60x.

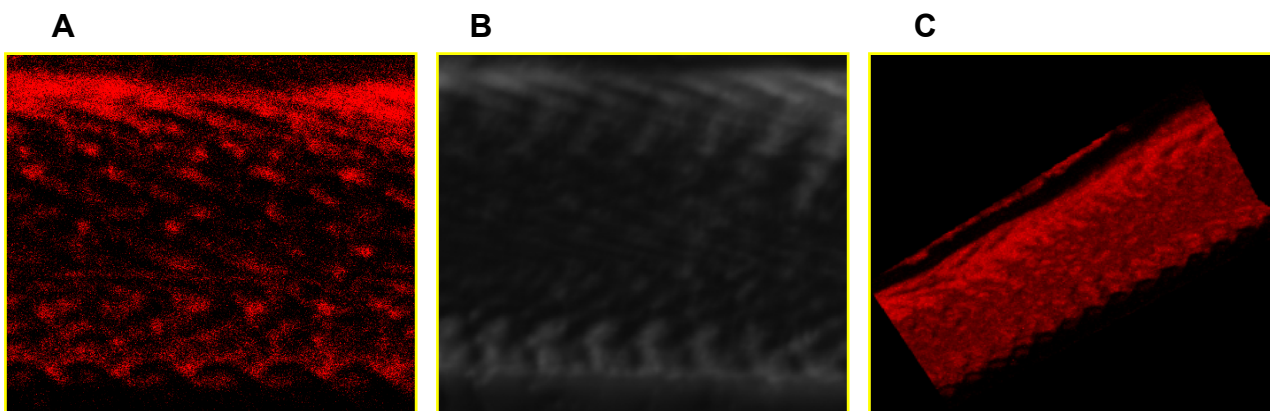


Figura 28. Distribución de GM1 En una fibra muscular marcada A) imagen confocal donde se observa que el GM1 se localiza en el sarcolema y tubulos transversos B) fibra control de GM1 donde se observa el patrón sarcómero C) imagen en 3D donde se observa la distribución membranal de GM1 en la fibra.

UNIDAD DE CONTRACTURA EN LA FIBRA MUSCULAR.

La observación no reportada previamente de una imagen de la fibra muscular, con un patrón regular que separa en segmentos de la misma medida con la misma periodicidad a lo largo del eje longitudinal de la fibra se presenta en tres casos en que las proteínas β -dístroglicano (Figura 29), actina (Figura 30) y Caveolina (Figura 31) son marcadas con sus respectivos anticuerpos.

β -DISTROGLICANO

En la Figura 29, la distancia de las **unidades de contractura** (UC) como las llamaremos a partir de ésta tesis tienen una distancia de $8.776 \mu\text{m} \pm 0.776$, la medida transversal de estas UC es de $11.16 \mu\text{m}$.

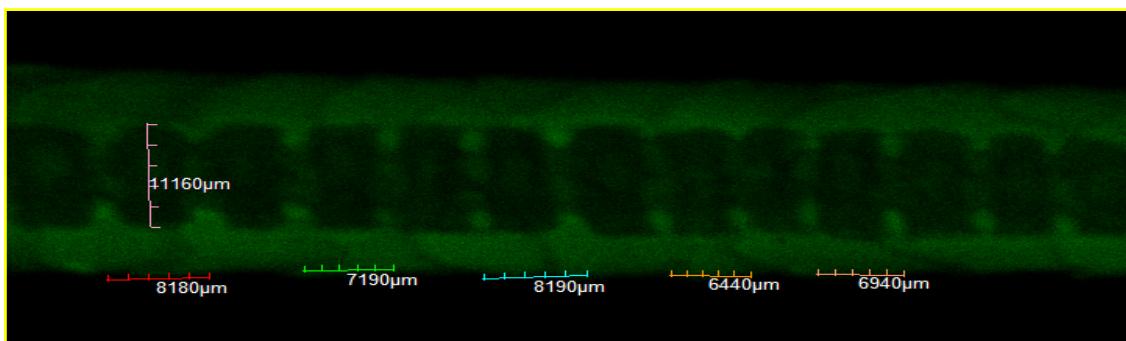


Figura 29. Longitudes de las unidades de contractura muscular para β -DG. Se observa el patrón nunca antes visto de una contractura muscular en donde las medidas son muy semejantes.

El calculo de la media y desviación estándar es el siguiente

Media:

$$x = \frac{8.18 + 7.18 + 8.19 + 6.44 + 6.94}{5} = 8.776$$

Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\sigma = \sqrt{1/5((8.18 - 8.77)^2 + (7.18 - 8.77)^2 + (8.19 - 8.77)^2 + (6.44 - 8.77)^2 + (6.94 - 8.77)^2)}$$

$$\sigma = 0.7760$$

α -ACTINA

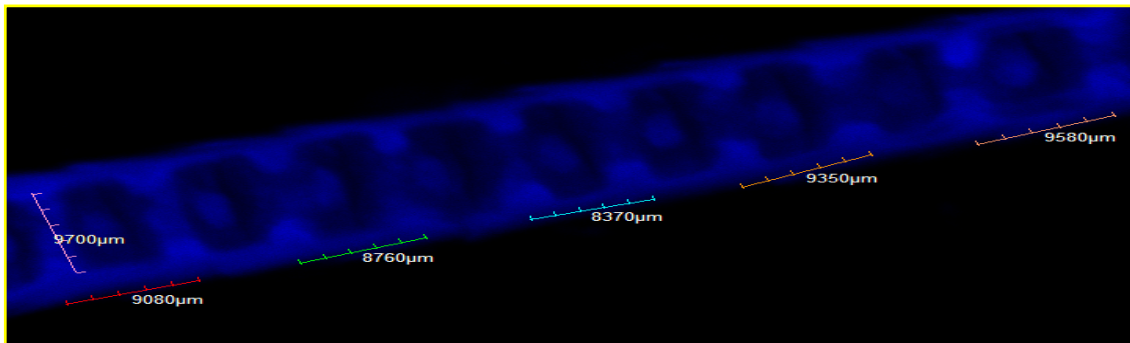


Figura 30. Longitudes de las unidades de contractura muscular para α -actina. Se observa el patrón nunca antes visto de una contractura muscular en donde las medidas son muy semejantes.

En la Figura 30, la distancia de las **unidades de contractura** (UC) es $9.028 \mu\text{m} \pm 0.478$, la medida transversal de estas UC es de $9.70 \mu\text{m}$.

CAVEOLINA-3

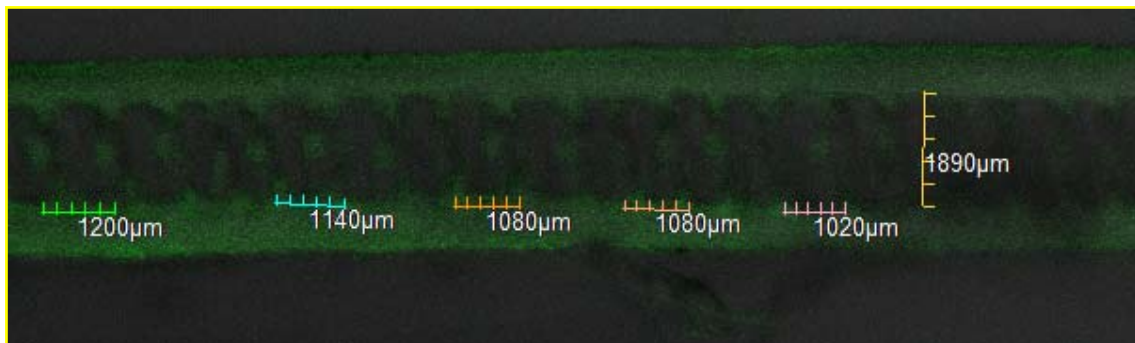


Figura 31. Longitudes de las unidades de contractura muscular para Caveolina-3. Se observa el patrón nunca antes visto de una contractura muscular en donde las medidas son muy semejantes.

En la Figura 31, la distancia de las **unidades de contractura** (UC) es $1.104 \mu\text{m} \pm 0.684$, la medida transversal de estas UC es de $1.89 \mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

La contracción en el músculo esquelético tiene como consecuencia una deformación de la fibra durante el acortamiento, por lo que las proteínas contráctiles deben permanecer conectadas con la sarcolema (SL) y ésta a su vez con la Matriz Extracelular (ME) a fin de que el movimiento se transmita de manera simultánea a las fibras vecinas y se origine la fuerza sumatoria de la actividad muscular. De lo contrario, el movimiento aislado de las fibras no generaría fuerza y resultaría en daño de las membranas plasmáticas y muerte celular. Una de las funciones del complejo distrofina-glicoproteína (DGP) es la de ser el intermediario en la comunicación de las proteínas del citoesqueleto con las proteínas de la ME lo que conformaría el aparato costamérico.

El complejo DPG se localiza casi exclusivamente en la SL de manera periódica paralela a la línea Z y a los TT (tubulos transversos), a una distancia uniforme lo que le da la característica junto con las proteínas del citoesqueleto a formaciones en anillos periódicos o costillas “costameras” (Fig. 4 de Introducción, 23 y 24 en la sección de resultados) . Aunque el complejo DGP no es parte constitutiva de los TT siendo éstos una continuidad de la sarcolema que forman una red a lo largo y ancho de la fibra, especialmente intrincada y extensa en el músculo esquelético. Por lo tanto la distribución del complejo DGP, que encontramos en el músculo de la rata, sugiere que la membrana no es una entidad homogénea.

Los resultados obtenidos demuestran que el complejo distroglicano está formado por α y β distroglicano y prolonga el sarcolema interaccionando directamente con la distrofina por dentro del sarcolema y la laminina en la matriz extracelular. El α -distroglicano es extracelular y se une con el β -distroglicano. Ambas proteínas están codificadas por un mismo gen que se encuentra en el cromosoma 3, el patrón sarcómero no se observa en el α -distroglicano debido a que el anticuerpo para la localización de la proteína se pegó en la matriz extracelular y no permitió ver el patrón sarcómero como sucede también en el caso de la laminina, que a pesar de saberse que es una proteína costamérica al estar en contacto con las proteínas del tejido conectivo no se permite observar una distribución regular.

En el caso de la distrofina es una proteína de alto peso molecular que se encuentra en la región subsarcolemal y que tiene una distribución definida a lo largo de la línea Z, la distrofina es quizás la proteína más representativa de las Costaneras, por su importancia en la patología de las Distrofias musculares.

La actina es una proteína globular que forma los microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células eucariotas, puede encontrarse en forma libre o polimerizarse en microfilamentos, que son esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular. En este trabajo demostramos que la α -actina se encuentra en el citosol y tiene sitios de unión con la distrofina. El hecho de que la actina tenga una distribución central en la fibra distribuida en forma longitudinal, como se muestra en la Figura 25, sin

estar en contacto con la Sarcolema podría sugerir que no participa en la actividad de las costameras y en su participación en la transmisión de fuerza lateral.

La caveolina-3, se han localizado, en el cromosoma 15, un gen cuyo producto es la calpaina, es un componente músculo-específico de una familia de proteasas calcio-dependientes que interacciona con la titina (connectina). Las caveolas son invaginaciones de 50-100nm que se encuentran en la mayoría de las células constituyendo un apéndice o subcompartimento de la membrana plasmática.

En nuestro caso la caveolina 3, uno de los miembros de esa familia, muestra una distribución específica en el músculo, coincidiendo con la distribución de la distrofina en el sentido sarcómero, pero a diferencia de la distrofina, la caveolina-3, pareciera encontrarse en el interior de la fibra. Siguiendo la Caveolina una proteína de membrana, la única explicación de su localización intracelular, que es este presente en los tubulos transversos. El glicofosfolipido GM1, también presenta la misma distribución que la caveolina-3, lo que los ubica en la formación de regiones membranales especializadas, conocidos como "lipid rafts" y "caveolas".

La caveolina-3 es parte fundamental de los tubulos transversos ya que esta es la que permite las invaginaciones para que se formen estos en el músculo esquelético y esta proteína se encuentra tanto en el citosol como en la matriz extracelular el patrón sarcómero de la caveolina es menor que en las otras proteínas debido a que principalmente se encuentra distribuida la proteína en la línea M de la fibra muscular. Dado que la α - laminina es una glicoproteína que forma parte de la lámina basal tiene una longitud de 120 nm, y atraviesa todas las capas de la lámina basal.). En nuestro caso, esta proteína fue localizada en la matriz extracelular principalmente en el tejido conectivo de varias fibras musculares y se sabe, tiene sitios de unión en la región C-Terminal del α - distroglicano. Por lo que pensamos que su función sería la de anclar a las células a la lámina basal pues tiene sitios de unión para moléculas de integrinas de la membrana celular de la base celular, tal como los datos encontrados (Figura 27).

El la figura 32 esquematizamos un modelo de la distribución de las proteínas determinas en este trabajo por microscopia confocal.

El señalamiento en esta tesis, de la formación de lo que llamamos "Unidades de contractura" es un hallazgo que requiere más estudio. Sin embargo, es válido especular sobre su origen. La presencia de estas estructuras aparece relacionada con contracciones de la fibra, aunque en el caso de las imágenes obtenidas con β -distroglicano y actina, la célula fue permeabilizada para la incorporación de los anticuerpos, en el caso de las imágenes obtenidas con caveolina-3, no hubo permeabilización y sin embargo se observan las UC, en éstas condiciones, la fibra es capaz de contraerse.

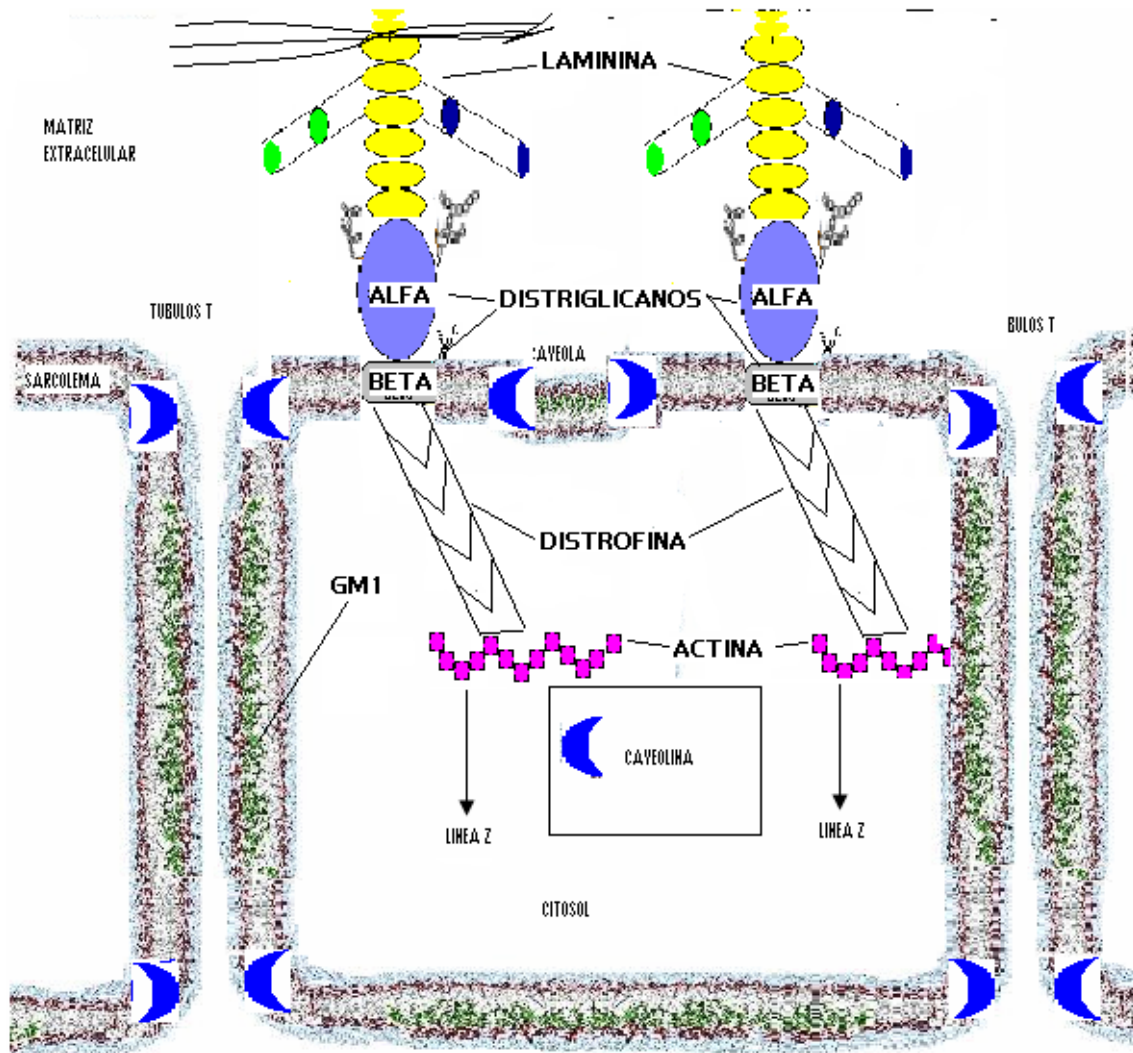


Figura 32. Esquemización de un modelo de la distribución de las proteínas determinadas en este trabajo por microscopia confocal

Aunque el patrón es regular en todas las condiciones, la distancia de las UC es diferente e incluyen a una cantidad diferente de sarcómeros. En el caso del β -dístroglicano y la caveolina, que tienen una localización sarcolemal, parece que la Sarcolema está deformada, con proyecciones al interior de la fibra simulando un acortamiento de la misma. Sin embargo en el caso del marcaje de la actina, que no involucra a la sarcolema pero sí al aparato contráctil, se observa un patrón de distribución de las UC similar al de las proteínas membranales. Recientemente en estudios aun no publicados en el Laboratorio de la Dra. Dr. Alice B. Fulton, se marcó a la Titina, proteína importante en el acortamiento de la sarcómera durante la contracción y su patrón de distribución se muestra en la Figura 33. Esta imagen sugiere que existe una relación entre la titina y estas unidades de contractura.

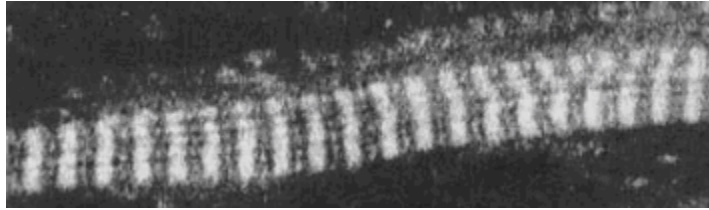


Figura 33. Inmunofluorescencia de la titina en una fibra muscular aislada, Periodicidad de las estructuras de titina es de $\sim 1.4 \mu\text{m}$.

CONCLUSIONES

- El α -Distroglicano se localizo en la cara externa de la Sarcolema en contacto con la matriz extracelular de la fibra muscular sin presentar patrón sarcómero definido.
- El β -distroglicano se localiza en la parte interna del sarcolema sin tocar la matriz extracelular.
- La distrofina se localiza en la pared interna de la membrana del sarcolema presentando un patrón sarcómero definido.
- La α -actina se encuentra muy concentrada en la zona central de la fibra relacionada con el aparato contráctil de la fibra muscular.
- La caveolina-3 tiene localización membranal en la Sarcolema y en los tubulos transversos que se internan en la fibra muscular.
- La localización de laminina es únicamente en asociación con el tejido conectivo de la matriz extracelular que une a las fibras musculares en el tejido.
- La localización de GM1 se dio a lo largo de la sarcolema y en el interior de la fibra siguiendo la distribución de los tubulos transversos principalmente.
- Las denominadas Unidades de Contractura en la fibra muscular aislada son estructuras que pueden estar asociadas con la actividad de la titina durante eventos de contractura.

Los puntos anteriores, indican una localización de estas proteínas, lo que involucra una comunicación entre proteínas sarcomericas y costamericas lo que estará relacionado con la transmisión de fuerza en el fenómeno de la contracción muscular,

ANEXO 1 (Abreviaturas)

SL- SARCOLEMA

TT- TUBULOS TRANSVERSOS

DGP- COMPLEJO DISTROFINA-GLICOPROTEINA

RS- RETICULO SARCOPLASMICO

CT- CISTERNAS TERMINALES

ATP-ADENOSÍN TRIFOSFATO

ADP-ADENOSÍN DIFOSFATO

DG-DITROGLICANO

KDa. KILODALTONES

MC-MICROSCOPIA CONFOCAL

EDL-EXTENSOR DIGITORIUM LONGUS

Mm-MILIMOLAR

μm-MICROMOLAR

FIG-FIGURA

ME - MATRIZ EXTRACELULAR

UC-UNIDADES DE CONTRACTURA.

ANEXO 2 (GLOSARIO)

Anisotropico: Se refiere a la particularidad o capacidad que tiene un cuerpo de expandirse en sus diversas direcciones dependiendo de la luz que refleje. Tienen distintas propiedades físicas en diferentes direcciones

Caveolas: son estructuras dinámicas que pueden ser invaginaciones o pueden ser planas, estas últimas no son detectables morfológicamente.

Costameras: proteínas involucradas en la transmisión de fuerza lateral.

Fascículo: Pequeños haces de fibras envueltos por una vaina de tejido conectivo, el perimisio

Fibras (Células) Musculares: Representan las células individuales. Su diámetro fluctúa entre 10 y 80 micrones (μm), mientras que su longitud es la misma que el músculo a que pertenece. Puede tener más de 35 cm. de larga. El número de fibras por cada músculo varía; depende del tamaño y función del músculo.

Hipertrofia. Aumento del tamaño de las fibras musculares.

Hiperplasia. Aumento del número de fibras musculares.

Isotropico: Tienen las mismas propiedades en todas sus direcciones. Se ve igual en todas sus direcciones al ojo óptico.

Miofibrilla: Representan largos filamentos que contiene cada fibra músculo esquelética, los cuales representan los elementos contráctiles de los músculos esqueléticos. Las miofibrillas se dividen en sarcómeros.

Retículo Sarcoplasmático: Son una compleja red longitudinal de túbulos o canales membranosos. Corren paralelos a las miofibrillas (y sus miofilamentos) y dan vueltas alrededor de ellas.

Sarcolema: El sarcolema es la membrana externa de plasma que rodea cada fibra muscular.

Sarcómero: Representa la unidad funcional básica (más pequeña) de una miofibrilla. Son las estructuras que se forman entre dos membranas Z consecutivas.

Sarcoplasma: Representa la parte líquida (gelatinosa) de las fibras musculares.

Tensión: valor de la distribución de fuerzas por unidad de área en el entorno de un punto material dentro de un cuerpo material o medio continuo.

Túbulos Transversos (Túbulos T): Son extensiones del sarcolema que pasan lateralmente a través de la fibra muscular. Se encuentran interconectados (entre miofibrillas). Sirven de vía para la transmisión nerviosa (recibido por el sarcolema) hacia las miofibrillas

Unidad motora: Se entiende por unidad motora al conjunto de fibras musculares esqueléticas inervadas por ramificaciones del axón de una misma neurona motora y que, en consecuencia, son estimuladas simultáneamente a contraerse.

Unión neuromuscular: es la sinapsis entre un nervio motor y una fibra muscular.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Adrian, R.H., Constantin, LL. and Peachey, L.D. 1969. Radial spread of contraction in frog muscle fibres. *Journal of physiology*: 204: 231-257.
- 2) Arthur W Ham. 1985. tratado de Histología. 8^{va} edición, edit. Interamericana, México D.F. Pag. 605-633
- 3) Arthur C Guyton. 1995. Fisiología y Fisiopatología. Quinta edición Edit. Interamericana. México D.F. Pag. 46-51.
- 4) Barbosa-Barros M. 2002. Óxido nítrico: un campo abierto para la Angiología y Cirugía Vascular. *Angiología*; 54: 472-91.
- 5) Bastian, J and Nakajima, S. 1998, Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle. *Journal of general physiology*: 63: 257-278.
- 6) Bonales Alatorre E. 2004. Estructura y función de los microdominios de membrana. Universidad de colima, Tesis de Maestria.
- 7) Bowe, M. A., Deyst, K. A., Leszyk, J. D. and Fallon, J. R. (1994). Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 12, 1173-1180.
- 8) Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K. and Brecht, D. S. 1995. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743-752.
- 9) Cohn, R. D. and Campbell, K. P. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23, 1456-1471.
- 10) Cote, P. D., Moukhles, H., Lindenbaum, M. and Carbonetto, S. 1999. Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses. *Nat. Genet.* 23, 338-342.
- 11) Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C. and Campbell, K. P. 1997. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 272, 31221-31224.

- 12) Durbeej, M., Larsson, E., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Roberds, S. L., Campbell, K. P. and Ekblom, P. 1995. Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. *J. Cell Biol.* 130, 79-91.
- 13) Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809-823.
- 14) Furchgott RF. Endothelium-Dependent relaxation in systemic arteries. In Vanhoutte PM, ed. Relaxing and contracting factors. Biological and clinical research. New Jersey: Humana Press; 1988. p. 1-21.
- 15) Goldie RG, Spalding LJ, Pudney CJ, O' Connor BJ, Page CP. Confocal microscopy and the quantitative assessment of neuron densities in human asthmatic and non-asthmatic bronchus. *Eur Respir J* 1998;12 (suppl 28):453S, Abstract p. 2943.
- 16) Hack AA; Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadhazy MR, Sweeney HL, McNally EM. 2000. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci.*;113(pt 14): 2535–2544.
- 17) Henry, M. D. and Campbell, K. P. 1998. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95, 859-870.
- 18) Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W. and Campbell, K. P. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355, 696-702.
- 19) Inoué S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: Pawley J, editor. Handbook of biological confocal microscopy. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1995. p. 1-17.
- 20) Iwan Walev, Sebastian Chakrit Bhakdi, Fred Hofmann, Nabil Djonder, Angela Valeva, Klaus Aktories, and Sucharit Bhakdi. 2001. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. Vol. 98 No. 6, 3185–3190
- 21) J.A.F Tresguerras. 1992. Fisiología Humana. Interamericana – Mac Graw-Hill. Madrid, España. Pag. 3-11
- 22) James M. Ervasti, 2003, Costameres: the Achilles' Heel of Herculean Muscle, The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 278, No. 16, pp. 13591–13594

- 23) Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S. and Campbell, K. P. 1995. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on betadystroglycan. *J. Biol. Chem.* 270, 27305-27310.
- 24) Larios Escalante A. 1998. Estructura y función del músculo esquelético. Univerisidad de colima, México D.F. 6-40. Tesis de Doctorado.
- 25) López-Farré A, Farré J, Sánchez-de Miguel L, Romero J, González-Fernández F, Casado S. Disfunción endotelial: una respuesta global. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51 (Supl 6):18-22.
- 26) Patrice D. Cote, Hakima Moukhles, and Salvatore Carbonetto. 2002. Dystroglycan Is Not Required for Localization of Dystrophin, Syntrophin, and Neuronal Nitric-oxide Synthase at the Sarcolemma but Regulates Integrin $\alpha_7\beta_1$ Expression and Caveolin-3 Distribution. Vol. 277, No. 7, Issue of February 15, pp. 4672–4679.
- 27) Paul J. Rigby, Roy G. Goldie. 1999. Biomedical Confocal Microscopy Research Centre, Department of Pharmacology, University of Western Australia, Nedlands, Western Australia, Australia. Volume 40, Number 3
- 28) Rando TA, The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2001 Dec;24(12):1575-94.
- 29) Rita Barresi and Kevin P. Campbell. 2005. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *Journal of Cell Science* 119, 199-207.
- 30) Robert J. Bloch and Hugo Gonzalez-Serratos. 2003. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Rev.* Vol. 31, No. 2, pp 73-78.
- 31) Rovira I. Óxido Nítrico. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 1995; 42: 15-23.
- 32) Rumberger E. 2002. Fisiología y teoría del entrenamiento. *Rev.* Vol. 22, No. 3, pp 15-30
- 33) Straub, V. and Campbell, K. P. 1997. Muscular dystrophies and the dystrophin glycoprotein Complex. *Curr. Opin. Neurol.* 10, 168-175.

- 34) Tian, M., Jacobson, C., Gee, S. H., Campbell, K. P., Carbonetto, S. and Jucker, M. 1996. Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2739-2747.
- 35) Tokarz SA, Duncan NM, Rash SM, Sadeghi A, Dewan AK, Pillers DA. 1998, Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. Dec; 65(4):272-81.
- 36) Yamada, H., Shimizu, T., Tanaka, T., Campbell, K. P. and Matsumura, K. 1994. Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS, Lett.* 352, 49-53.
- 37) William F. Ganong.2000. Fisiologia medica. Edit. Mac Graw-Hill. Madrid, España.