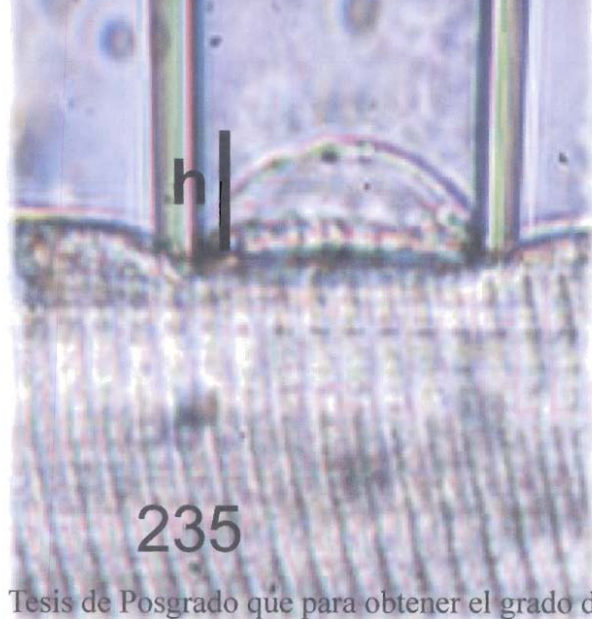


Estudios funcionales y estructurales
del complejo sarcolema costamera
en musculo esquelético de mamífero.
En condiciones normales y patológicas



235

Tesis de Posgrado que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias

presenta

Fis. Karla Paola Garcia Pelagio



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.

Estudios funcionales y estructurales del complejo sarcolema-costamera en músculo esquelético de mamífero. En condiciones normales y patológicas.

Alumna: Fis. Karla Paola García Pelagio

Tutor: Dra. Alicia Ortega Aguilar

Índice

	Página
Lista de símbolos y abreviaciones	4
Resumen	5
Abstract	6
Capítulo I Generalidades	7
1.1 Antecedentes	7
1.2 Conceptos básicos sobre músculo	10
1.2.1 Tipos de músculo	10
1.2.2 Músculo esquelético	12
1.2.2.1 Estructura de la célula muscular esquelética	14
1.2.2.1.1 Sarcómero, la unidad funcional contráctil	15
1.2.2.1.2 Proteínas contráctiles: miosina y actina	17
1.2.2.1.3 Proteínas costaméricas	19
1.2.2.2 Membranas biológicas	26
1.2.2.2.1 Sarcolema	27
1.2.2.2.2 Sistema sarcotubular	27
1.2.3 Función muscular	29
1.2.3.1 Tipos de contracciones	30
1.2.3.2 Acople excitación-contracción en las células musculares	30
1.2.3.3 Teoría del deslizamiento	32
1.2.4 Transmisión de fuerza a través del sarcolema	36
1.2.4.1 Transmisión de fuerza lateral	36
1.2.4.2 Tejido conectivo como elemento elástico	38
1.2.5 Distrofias musculares relacionadas con las costámeras	39
1.2.5.1 Modelos murinos	40
Capítulo II Planteamiento del problema e Hipótesis	42
Capítulo III Objetivos	43
3.1 Objetivo general	43
3.2 Objetivo particular	43
Capítulo IV Materiales y métodos	44
4.1 Animales	44
4.2 Obtención de fibras aisladas	44
4.2.1 Plato circular	47
4.2.2 Cámara experimental	47
4.3 Elaboración de las pipetas	47
4.4 Obtención de las fotografías	48
4.5 Elastimetría	48
4.6 Elastimetría en las células musculares esqueléticas	52
4.7 Obtención de los valores de rigidez en el modelo elástico distribuido	53
4.8 Estadística	53
Capítulo V Resultados	55
5.1 Propiedades mecánicas del sistema sarcolema, costameras y miofibrillas en el ratón normal (WT)	55
5.1.1 Desplazamiento vertical (h) del domo como función de la presión de succión, P	55

5.1.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto	59
5.1.3 Comportamiento elástico del sistema sarcolema-costameras-miofibrillas de la célula muscular esquelética	63
5.2 Propiedades mecánicas del sistema sarcolema, costameras y miofibrillas en el ratón sin distrofina (<i>mdx</i>)	67
5.2.1 Desplazamiento vertical (h) del domo como función de la presión de succión, P	67
5.2.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto	70
5.3 Propiedades mecánicas del sistema sarcolema, costameras y miofibrillas en el ratón sin desmina (<i>des</i> ^{-/-})	73
5.3.1 Desplazamiento vertical (h) del domo como función de la presión de succión, P	73
5.3.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto	76
5.4 Comparación de las propiedades mecánicas entre los ratones <i>WT</i> , sin distrofina o sin desmina	78
5.4.1 Desplazamiento vertical (h) del domo como función de la presión de succión, P	78
5.4.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto	80
5.4.3 Comportamiento elástico del sistema sarcolema-costameras-miofibrillas de la célula muscular esquelética	82
 Capítulo VI Modelo mecánico elástico equivalente de las proteínas costaméricas como un circuito distribuido	 86
6.1 Construcción del modelo distribuido	86
6.2 Solución al modelo distribuido	88
 Capítulo VII Discusión y conclusiones	 92
 Capítulo VIII Bibliografía	 101
 Anexo I Conceptos físicos	 109
A1.1 Presión y fuerza	109
A1.2 Presión hidrostática	110
A1.3 Tensión	111
A1.4. Rigidez	113
 Anexo II Índice de figuras	 114
 Anexo III Currículo vitae	 116
 Anexo IV Artículo Biomechanics of the sarcolemma and costameres in single skeletal myofibers from normal and dystrophin- null mice	 119

Resumen

La ausencia o disminución de la distrofina o de la desmina, dos proteínas que conforman a las costameras causan enfermedades en el ser humano como la distrofia muscular de Duchenne o de Becker. Las costameras son importantes en la transmisión de fuerza lateral en el músculo estriado, por lo que se estudiaron las propiedades biomecánicas del sarcolema y sus uniones con el aparato contráctil a través de las costameras teniendo como modelo experimental las células musculares únicas del Extensor Digitorum Longus de ratón normal (*WT*), sin distrofina (*mdx*) o sin desmina (*des-/-*). Se usó el elastómetro para aplicar presiones de succión (**P**) a través de una micropipeta colocada en el sarcolema, generando un domo sarcolemal de altura variable (h). La h del domo era dependiente de la **P** aplicada. Para **P** grandes, las conexiones entre el sarcolema y las miofibrillas, que ocurre en las costameras, se rompía; al seguir aumentando la **P**, el sarcolema explotaba. Se registraron los valores de **P** y se midió h a fin de generar las curvas **P**-h para cada experimento. De éstas curvas se calcularon parámetros como la tensión (γ), la rigidez (k) y la presión que tolera el sistema total conformado por sarcolema, las costameras y el aparato contráctil, así como de cada uno de sus componentes. Los valores de γ , k y **P** de todo el sistema, del sarcolema y de las costameras fueron significativamente más bajos (1.8-3.3) y (0.8- 1.9) veces en los músculos de ratones *mdx* y *des-/-* respectivamente comparados con los valores de *WT*. Nuestros resultados indican que la ausencia de distrofina reduce la rigidez muscular significativamente y en menor proporción la ausencia de desmina, aumentando así la deformabilidad del sarcolema y comprometiendo la estabilidad mecánica de las costameras y sus conexiones con las miofibrillas cercanas. Se desarrolló un modelo elástico distribuido basado en resortes acoplados en serie y en paralelo tomando como referencia las principales proteínas que unen al sarcolema con el aparato contráctil, en las costameras. Para evaluar este modelo se tomaron como referencia los resultados experimentales para ser comparados con los valores teóricos iterados de k para cada elemento. La diferencia entre estos dos valores no fue mayor al 20%. Esto sugiere que nuestro modelo es una primera aproximación del sistema biológico que trata de explicar. El modelo, al igual que nuestros datos experimentales indican que la distrofina es la proteína que más contribuye en las conexiones entre el sarcolema y el aparato contráctil. Este modelo puede ser usado para predecir la biomecánica de las costameras en diferentes modelos murinos.

Abstract

The absence or reduction of dystrophin or desmin, two conforming proteins of the costameres cause muscular diseases in humans such as Duchenne or Becker muscular dystrophy. We studied the biomechanical properties of the sarcolemma and its links to the contractile apparatus through costameres. Costameres are important in the transmission of lateral force in skeletal muscle. We used single mammalian myofibers of *Extensor digitorum longus* muscles isolated from wild (WT), dystrophin- (mdx) or desmin- null mice (des-/-). Suction pressures (P) applied through a micropipette to the sarcolemma generated a bleb, the height of which increased with increasing P. For large Larger increases in P broke the connections between the sarcolemma and myofibrils and eventually caused the sarcolemma to burst. We used the value of P at which these changes occurred to generate P-h curves to estimate the tensions (γ), stiffness (k) and P before the system broke of the system and of its individual elements. The values of γ , k and P of the whole system were significantly lower (1.8-3.3 fold) and (0.8-1.9 fold) in mdx and des-/- muscles respectively compared to WT. Our results indicate that the absence of dystrophin reduces significantly muscle stiffness and to a lesser extent the absence of desmin, thereby increases sarcolemma deformability, and compromises the mechanical stability of costameres and their connections to nearby myofibrils. We have modeled the links between the sarcolemma and the myofibrils, mediated by costameres, as a distributed model of elastic constants, k, corresponding to the main protein components of the costameres. To evaluate this distributed spring system in light of our experimental results we iterated k values for each conforming protein. The difference between the theoretical and experimental value was not greater than 20%. This suggests that our model is a good approximation of the structures that make up the structures under study. The model paired with our experimental results, indicates that dystrophin is the protein that contributes more than any other protein to the strength of the connections between the sarcolemma and the contractile apparatus, established at costameres. This model can be used to predict results of future experiments done with murine models lacking other proteins of the costameres.

Capítulo I

Generalidades

1.1 Antecedentes

Las costameras son estructuras en el sarcolema de las fibras musculares que se alinean circunferencialmente con los discos Z y las bandas M de las miofibrillas más cercanas. Las costameras mantienen y coordinan la organización del sarcolema con el aparato contráctil subyacente, así como también aseguran que las distorsiones que sufre el sarcolema durante las contracciones isotónicas, en donde se reduce la longitud del sarcómero por debajo de la longitud de equilibrio sean pequeñas y periódicas (Bloch et. al., 2002; Bloch y González-Serratos 2003; Anastasi et. al., 2008). Las costameras también organizan algunos dominios de membrana en el sarcolema que son ricos en proteínas, en moléculas de señalización, en canales iónicos y en bombas, que en conjunto son esenciales para una adecuada función fisiológica de los músculos estriados (Williams y Bloch 1999; Oak et. al., 2003; Ervasti 2003). Constituyen una estructura esencial en la transmisión de la fuerza lateral de las miofibrillas a través del sarcolema a la matriz extracelular y, finalmente a los tendones (Bloch y González Serratos, 2003). Cuando se presentan defectos en las proteínas de las costameras se puede comprometer la producción de fuerza muscular durante la contracción, ya sea directamente, mediante la reducción de la eficiencia de la transmisión de fuerza lateral, o indirectamente, por el aumento posibilidades de que el sarcolema se debilite y se dañe, resultando así en la degeneración o muerte de las células musculares (Reed y Bloch 2005; Blaauw et. al., 2008).

Muchas distrofias musculares son asociadas con una profunda debilidad y fragilidad de las fibras musculares (Barton 2006), así como también se han relacionado con alteraciones en las proteínas costaméricas como la distrofina (Hoffman et. al., 1987; Williams y Bloch,1999; Rybakova et. al., 2000; Ervasti 2007), la desmina (Agbulut et. al., 2001), los sarcoglicanos (Nigro et al. 1996, Williams y Bloch 1999; Lapidis et. al., 2004) y los distroglicanos (Ozawa, 1998; Campbell y Stull 2003; Ayalon et. al., 2008).

La distrofina es una proteína del citoesqueleto con un peso molecular de 427 kDa enriquecida en las costameras y conecta al citoesqueleto con las proteínas integrales de la

membrana plasmática (Porter et. al., 1992; Williams y Bloch 1999; Rybakova et. al., 2000; Ursitti et. al., 2004; Bhosle et. al., 2006; Ervasti 2007; Stone et. al., 2007) y a través de la membrana hacia la lámina basal (Ohlendieck et. al., 1991; Dmytrenko et. al., 1993). La distrofina y las proteínas con las que se asocia en la membrana plasmática denominados el complejo distrofina-glicoproteína, se han vinculado con diferentes formas de distrofia muscular. En particular, la distrofia de Duchenne y de Becker que son causadas por mutaciones en el gen que codifica la distrofina llevando a su ausencia (Duchenne) o la disminución en el sarcolema (Becker). La desmina es una proteína importante de los filamentos intermedios con 53kDa de peso molecular que rodea a los discos Z y une a éstos con las miofibrillas superficiales, y por otro lado al sarcolema a través de las proteínas costaméricas (O'Neill et. al., 2002; Bär et. al., 2004, Wieneke et. al., 2000). La desmina contribuye a la alineación de los sarcómeros (Sam et. al., 2000; Li et. al., 1997; Balogh et. al., 2005) aparte juega un papel importante en la organización de organelos como el núcleo y la mitocondria. La ausencia de ésta proteína da como resultado las desminopatías.

Se han hecho varios estudios acerca del papel que juega la distrofina y la desmina en las costameras y su participación en la contracción muscular pero aún no se tiene un amplio conocimiento de sus funciones biomecánicas en el sarcolema ni de cómo es que los defectos de alguna de éstas proteínas conducen a las distrofias musculares (Nowak y Davies 2004; Claffin y Brooks, 2008).

Estudios realizados en murinos sin distrofina han demostrado que las miofibrillas esqueléticas tienen las costameras desorganizadas, misma observación se presenta en las biopsias de humanos con distrofias musculares (Porter et. al., 1992; Williams y Bloch 1999; Reed y Bloch, 2005). La ubicación y la estructura de la distrofina sugieren que ésta puede desempeñar un papel en la estabilidad, en la rigidez y en la organización del sarcolema. Consistente con esto, la distrofina refuerza mecánicamente al sarcolema protegiéndolo de las tensiones que sufre la membrana durante la contracción muscular (Zubrzycka-Gaarn et. al., 1988; Petrof et. al., 1993; Blaauw et. al., 2010.) Además, algunos autores (Rybakova et. al., 2000; Hutter et. al., 1991) han demostrado que la distrofina está estrechamente unida con el sarcolema aún si ésta es separada de las miofibrillas. La ausencia de distrofina en miotubos obtenidos a partir de músculos de ratón sin distrofina también ha sido vinculada a una reducción sustancial en la rigidez de la célula (Pasternak et. al., 1995). Sin embargo, Bobet et. al., (1998) y Wolff et al., (2006) reportaron que

no hay diferencias en las propiedades mecánicas pasivas ni en las propiedades contráctiles del músculo EDL entero de ratón normal o sin distrofina.

En el presente trabajo establecemos que existe la posibilidad de que la ausencia de distrofina o de desmina resulte en una disminución en la transmisión de fuerza pasiva lateralmente que va de las miofibrillas al sarcolema, además de que probablemente existan cambios en las propiedades costaméricas. Nosotros usamos la aspiración con una micropipeta para examinar las propiedades biomecánicas del sarcolema y de las costameras en fibras musculares normales, sin distrofina o sin desmina. Este método ha sido usado antes para medir la tensión superficial (Mitchison 1953) y las propiedades mecánicas de las membranas de las células (Rand 1964; Evans y Yeung 1989; Hochmuth 2000, Zhang et. al., 2007). Nosotros examinamos las propiedades biomecánicas de las fibras musculares de murino normal con el objetivo de determinar la tensión, la rigidez y el punto de ruptura de las uniones entre el sarcolema y miofibrillas cercanas, así como también como es que estas propiedades se ven afectadas por la ausencia de distrofina o de desmina.

1.2 Conceptos básicos sobre músculo

1.2.1 Tipos de músculo

Se identifican dos tipos de músculo de acuerdo a su estructura y función: el músculo estriado, que a su vez se divide en esquelético y cardíaco; y el músculo liso. Los músculos constituyen aproximadamente del 50-55% de peso corporal y la mayor parte corresponde al músculo esquelético. Tres procesos definen al músculo: 1. El proceso de excitación-contracción, 2. La relación de la fuerza con la velocidad de contracción y 3. La curva de fuerza desarrollada a diferentes longitudes musculares.

La palabra “músculo” (del griego *mys* que significa ratón) hace referencia a un ratón con cola que se mueve. Un músculo entero se compone de centenares de células musculares individuales también llamadas fibras musculares que están especializadas en generar fuerza y producir acortamiento. Cuando se observan las células musculares esqueléticas o cardíacas con un microscopio óptico, se nota la presencia de estriaciones características en forma de pequeñas franjas regulares que se extienden a lo largo de las fibras musculares. Por esta razón, se hace referencia a este tipo de músculo como estriado. El músculo liso carece de estriaciones y consta de capas de células fusiformes. En la figura 1.1 se muestra el aspecto microscópico de los diferentes tipos de músculo. Aún con estas diferencias estructurales, la base molecular del proceso de contracción-relajación es el mismo (Barret et. al., 2010).

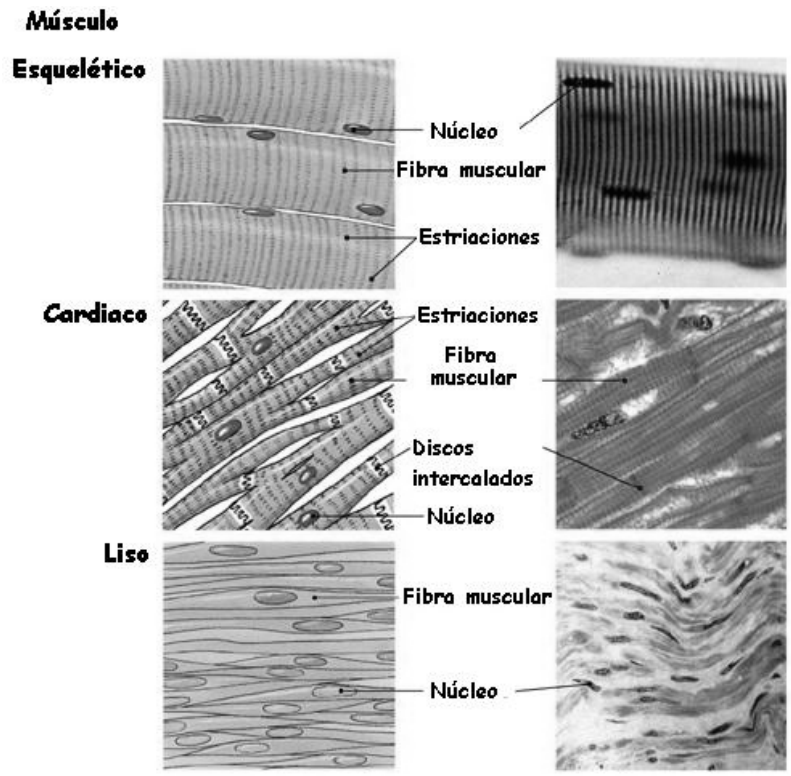


Figura 1.1 Representación esquemática (paneles del lado izquierdo) e histológica (paneles del lado derecho) del aspecto microscópico del músculo estriado (esquelético y cardiaco) y liso.

Tabla 1.1 Generalidades de los músculos esquelético, cardíaco y liso (Modificado de Barret et. al., 2010; Dvorkin et. al., 2010).

	Esquelético	Cardíaco	Liso
Aspecto histológico	Estriado; células multinucleadas, alargadas y finas	Estriado, células relativamente pequeñas, ramificadas con un solo núcleo central. Se observan abundantes uniones intercelulares llamadas discos intercalares	No tiene estriaciones, células fusiformes con un solo núcleo central
Localización	Cubre todo el esqueleto. Se halla en los miembros, tórax, pared abdominal, pelvis y cara	El miocardio es el componente muscular del corazón	Se encuentra en la pared del intestino, los vasos sanguíneos, conductos de las glándulas secretoras y paredes de los órganos
Tamaño de la Célula	40-60 μm de diámetro hasta 10 cm de longitud	15 μm de diámetro, 100 μm de longitud	2-10 μm de diámetro, 20-400 μm de longitud
Control	Voluntario/reflejo; controlado por el sistema nervioso somático	Poseen automatismo regulado por células marcapasos; el sistema nervioso autónomo puede alterar la frecuencia cardíaca	Control involuntario
Naturaleza de la contracción	Contracción y relajación rápida	Contracción espontánea y rítmica	Contracción lenta y mantenida
Función	Movimiento voluntario del esqueleto y mantenimiento de la postura. Implicado en los movimientos de la lengua y del globo ocular	Bombear la sangre desoxigenada a los pulmones y la sangre oxigenada a todo el cuerpo	Regulación del diámetro del vaso sanguíneo, contracción de los músculos de la base de cada folículo piloso, y otras

1.2.2 Músculo esquelético

El músculo esquelético es el motor de desplazamiento, la máquina del cuerpo. Los músculos están unidos a los huesos del esqueleto mediante tendones y sirven para producir movimientos y transmitir fuerza (Barret et. al., 2010).

No todas las células de un músculo esquelético tienen las mismas propiedades funcionales y morfológicas; los hay de contracción rápida y lenta. Los músculos esqueléticos pueden clasificarse en tres grupos según las siguientes características: 1) el aspecto morfológico

según su color y su histoquímica, 2) velocidades de la contracción y mantenimiento de la actividad sostenida y 3) grado de fatiga causada por la activación mecánica repetida. Los músculos de tipo I o de oxidación lenta, los de tipo IIa o de oxidación y glucólisis rápida, y los de tipo IIb o de glucólisis rápida.

Aunque estos tres criterios se utilizan para la clasificación de los músculos, las características mencionadas se traslapan entre los tres grupos (ver Tabla 1.2). El tipo dominante de las células musculares dentro de un músculo entero determina cómo se clasifica al músculo entero (Barret et. al., 2010).

Tabla 1.2 Clasificación de los tipos de fibras del músculo esquelético (Macintosh et. al., 2005)

Propiedades	Tipo I o lentas	Tipo IIa o rápidas	Tipo IIb o rápidas
Color	Rojas	Rojas	Blanca
Resistencia a la fatiga	Alta	Intermedia	Baja
Fuente de ATP	Oxidación	Oxidación	Glucólisis
Actividad de ATPasa en la miosina	Escasa	Alta	Alta
Velocidad de contracción	Lenta (>110ms)	Rápida	Rápida
Duración de la contracción	Larga	Corta	Corta
Mitocondrias	Abundantes	Abundantes	Escasas
Retículo sarcoplásmico	Bajo	Intermedio	Abundante
Mioglobina	Alta	Alta	Baja
Contenido de glicógeno	Bajo	Medio	Alto
Diámetro de la fibra	Pequeño	Intermedio	Grande

Los músculos tienen un excelente abastecimiento de sangre por medio de los capilares que forman una red entre fibras individuales. Las células nerviosas sensoriales y motoras penetran al músculo en una o dos ramas nerviosas. Las terminales de los nervios sensoriales tienen órganos sensitivos especializados que incluyen a los husos musculares (sensitivas al estiramiento) y los órganos tendinosos de Golgi (sensitivos a la tensión). El huso muscular censa la longitud del músculo por su grado de estiramiento o extensión muscular. La tensión del músculo es registrada por los receptores de Golgi, localizado en la matriz tendinosa afuera del músculo. Cuando la tensión producida por la contracción del músculo es detectada por el órgano de Golgi, las fibrillas de colágeno detectan el efecto mecánico, comprimiendo y alargando las terminales nerviosas dando como consecuencia la iniciación del potencial de acción (Dvorkin et. al., 2010).

1.2.2.1 Estructura de la célula muscular esquelética

El músculo esquelético está constituido por un gran número de células musculares (~1000 a 2000) con una geometría transversal en forma de elipsoidal o cilíndrica dependiendo del tipo de músculo (revisión de Gonzalez-Serratos y Bloch, 2003). La longitud de las células puede variar de unos milímetros hasta 30 cm en el humano adulto promedio y su diámetro varía desde 30 hasta 100 μm . Éstas se insertan a través de los tendones al hueso.

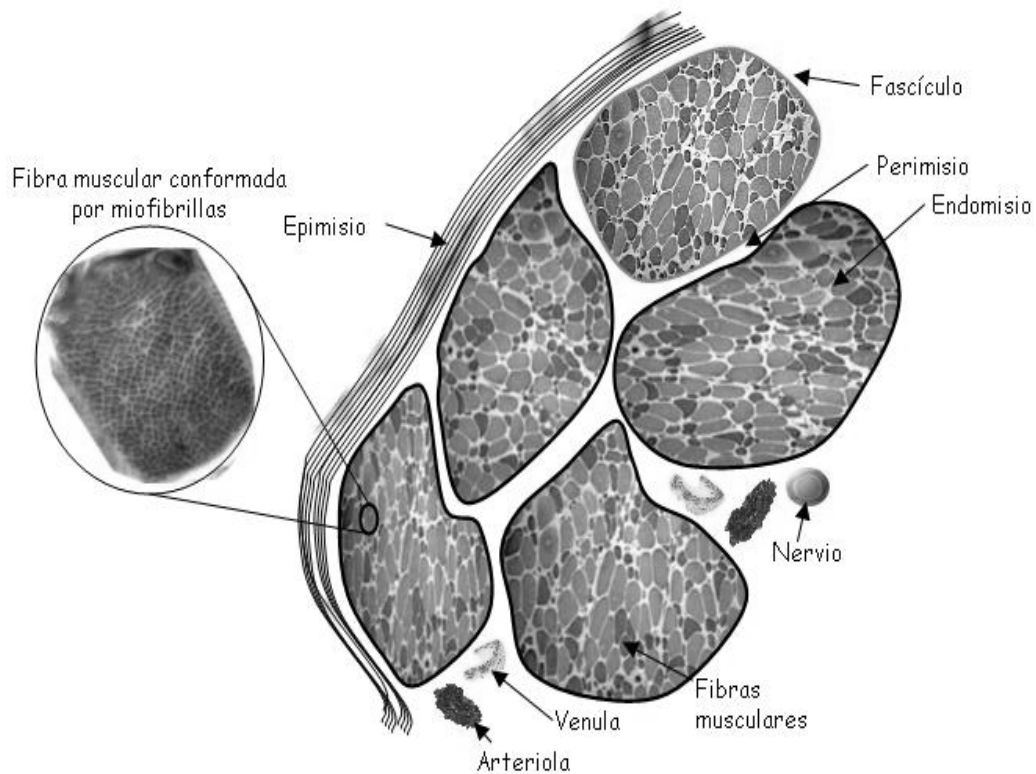


Figura 1.2 Sección transversal de músculo esquelético mostrando el tejido conectivo en un corte histológico. (Modificado de McComas, 1996)

1.2.2.1.1 Sarcómero, la unidad funcional contráctil

Las células musculares están formadas por haces filamentosos de 1-2 μm de diámetro que se extienden a lo largo de la célula, llamadas miofibrillas. Cada miofibrilla consta de una unidad morfológica funcional que se repite periódicamente, el sarcómero. La alineación de los sarcómeros con las miofibrillas adyacentes da lugar a las estriaciones características del músculo esquelético.

Si se observa una célula muscular con microscopia de luz polarizada o con microscopia de contraste de fase, los sarcómeros por sus diferencias en los índices de refracción se ven como bandas oscuras y claras alternadas perpendicularmente a lo largo del eje longitudinal de la célula muscular. La banda clara I formada por filamentos delgados (no refracta la luz polarizada por lo que es isotrópica) está dividida por la banda oscura Z (del alemán *zwischen*, entre) y permite el

anclaje de los filamentos delgados. La banda oscura A (refracta la luz polarizada por lo que es anisotrópica) está formada por los filamentos gruesos y tiene a la banda H mas clara en su centro, que corresponde a la región en donde los filamentos gruesos y delgados no se superponen cuando el músculo está relajado. También se observa una línea M (del alemán *mitte*, en medio) en la parte intermedia de la banda H (del alemán *hell*, luz), que es donde se establecen los enlaces entre los filamentos gruesos adyacentes. Entre dos líneas Z adyacentes se encuentra el sarcómero y está formado por dos medias bandas I y una banda A completa (Figura 1.3).

Los filamentos gruesos, que tienen un diámetro dos veces mayor que los delgados están formados por miosina, y los filamentos delgados están compuestos por actina, tropomiosina y troponina. Si se hace un corte transversal a través de la banda A, compuesta por los filamentos gruesos; se observa que cada filamento está rodeado por seis filamentos delgados con un patrón hexagonal regular (Inserto de la Figura 1.3).

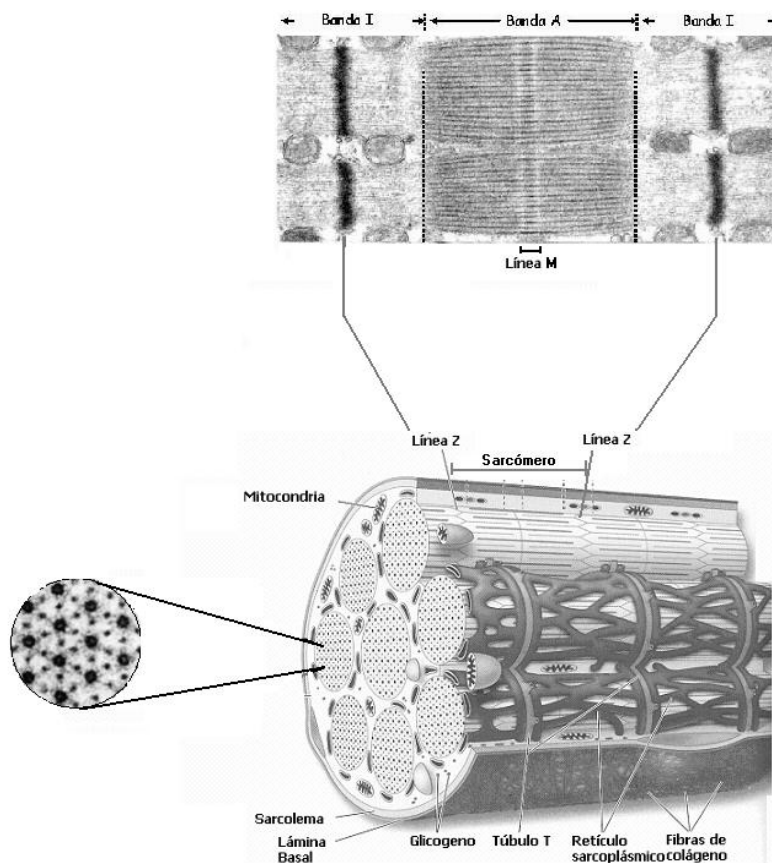


Figura 1.3 Esquema de una célula del músculo estriado con sus componentes.

1.2.2.1.2 Proteínas contráctiles: miosina y actina

Miosina

La miosina del músculo esquelético es parte de una familia evolutiva de 14 diferentes subfamilias de miosinas relacionadas entre sí y constituye la subfamilia II. Tiene 2 cabezas globulares y una cola larga. La cola tiene 2 ejes trenzados de 160 nm cada uno que terminan en una cabeza globular o cabeza de miosina. La parte inicial de la miosina está formada por la meromiosina ligera (MML) que tiene 90 nm. La MML se une en su parte final a la siguiente parte de la doble cadena de miosina o meromiosina pesada (MMP) de 65 nm. Contiene en su otro extremo las dos cabezas de miosina. La unión flexible entre las cadenas de MML y MMP permite que ésta se mueva alrededor del punto de unión entre ellas. La MMP está formada por el fragmento S₂ de 60 nm que incluye la “cabeza” terminal de la miosina o fragmento S₁ de ~19 nm. Las cabezas de miosina S₁ de cada cadena de meromiosinas están separadas una de la otra, se mueven libremente alrededor del punto de unión con la MMP (Figura 1.4) y forman la estructura globular capaz de hidrolizar el ATP para formar el ADP más fosfato inorgánico (Dvorkin, 2010).

Actina

Los filamentos delgados son polímeros compuestos por dos cadenas de actina que forman una doble hélice larga. La actina está formada por unidades globulares monoméricas individuales de G-actina. Cuando la G-actina se polimeriza, forma una estructura filamentosa llamada F-actina. La F-actina está formada por dos cadenas de monómeros de G-actina trenzadas entre sí. La distancia entre dos monómeros de actina es de 5.5 nm y una vuelta completa de la espiral se hace cada 37 nm. Las cadenas helicoidales de F-actina forman en conjunto los filamentos delgados (Figura 1.4) (Dvorkin et. al., 2010).

Proteínas reguladoras de la contracción

Las moléculas de tropomiosina son filamentos largos en forma de vara larga situados en la hendidura entre las dos cadenas de actina (Figura 1.4). Cada filamento delgado contiene ~300 a 400 moléculas de actina y ~40 a 60 moléculas de tropomiosina. Las moléculas de troponina son pequeñas unidades globulares situadas a lo largo de las moléculas de tropomiosina. En ausencia de calcio, i.e. en reposo, la tropomiosina cubre los sitios de unión entre las moléculas de actina y las cabezas S₁ de miosina. El complejo de la troponina consiste en: 1.La Troponina C (Tn-C) que tiene alta afinidad al calcio y que está unida a 2.La Troponina I (Tn-I) o sub-unidad inhibitoria que está unida a la actina e inhibe la interacción de miosina con actina pero cuya inhibición se

quita en presencia de calcio y 3.La Troponina T (Tn-T) que une a las otras dos subunidades de troponina con la tropomiosina (Inserto de la Figura 1.4) (Barret et. al., 2010).

Titina

La titina es la proteína mas grande descrita hasta el momento constituyendo cerca del 10% de la masa miofibrilar. Esta proteína se extiende desde la línea Z, en el extremo del sarcómero hasta unirse con el filamento grueso.

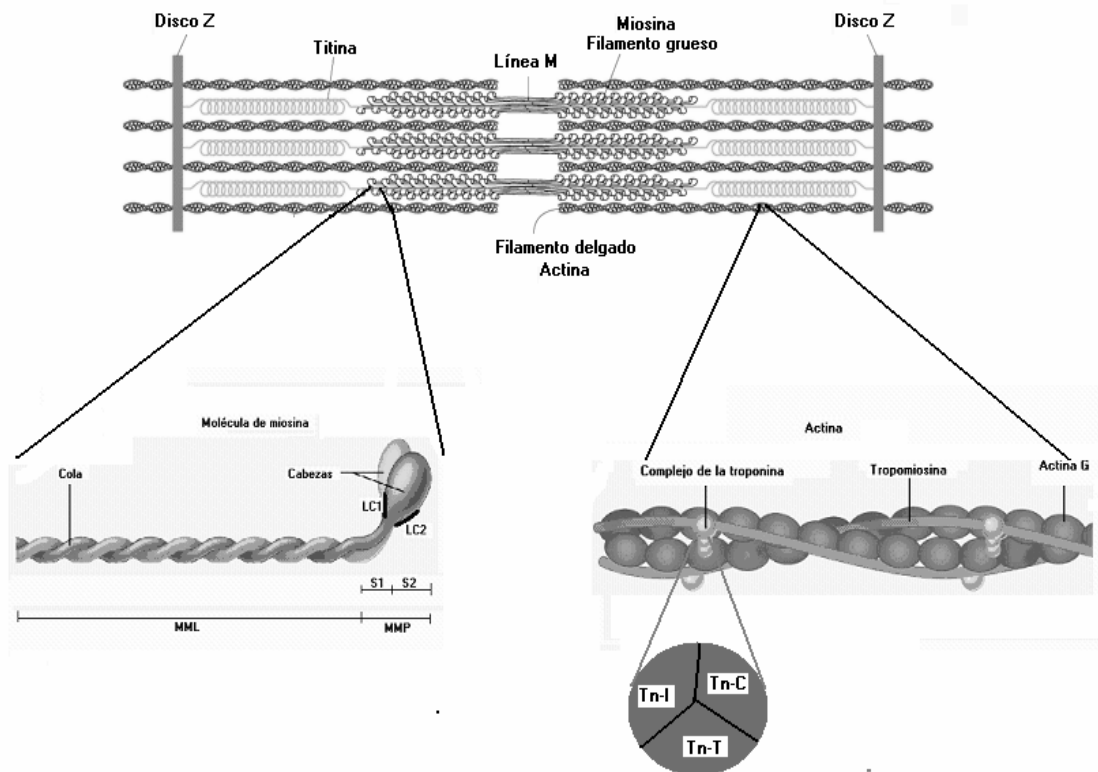


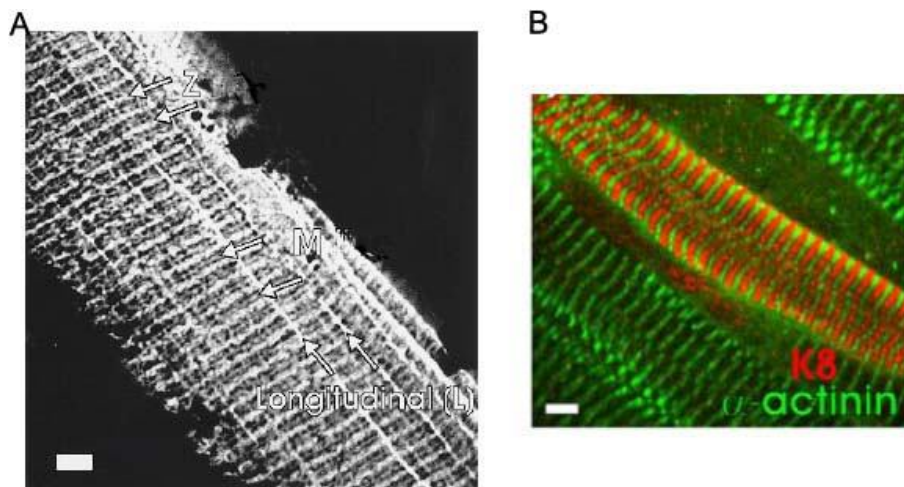
Figura 1.4 Disposición y estructura de los filamentos delgados (actina) y gruesos (miosina) en el músculo estriado. Como inserto se muestra el complejo de la troponina. (Modificado de Barret et. al., 2010; Dvorkin et. al., 2010).

1.2.2.1.3 Proteínas costaméricas

En 1983, Pardo y su grupo (Pardo et. al., 1983) encontraron unas estructuras proteicas que rodeaban la línea M y el disco Z que designaron con el nombre de costámeras por su semejanza a una costilla (“Costa”, del latín costilla y “mero” del griego parte). Estas estructuras regulares permiten al sarcolema moverse al unísono con las líneas Z y las líneas M además de la formación de crestas del sarcolema en las regiones intercostaméricas que sirven como ancla.

Las costameras son un cúmulo de proteínas integrales y periféricas que sirven como ancla entre el aparato contráctil y el sarcolema mediante los filamentos intermediarios a la matriz extracelular mediante la laminina (Pardo et. al., 1983; Bloch et. al., 2002). Éstas se localizan en la membrana plasmática del músculo esquelético, están presentes de manera rectilínea y homogénea en paralelo con el aparato contráctil. Tienen tres funciones principales: transmitir parte de la fuerza lateral a la matriz extracelular, mantener al sarcolema alineado y en registro con las estructuras contráctiles cercanas y proteger al sarcolema contra daños ocasionados por la contracción muscular (Ervasti y Campbell, 2003).

Con el uso de microscopia confocal, se pudo apreciar la localización de las costámeras en las fibras musculares. Se marcaron cortes histológicos de secciones transversales del músculo tibialis anterior de rata de 20 μm de espesor con un anticuerpo contra la α -actina, β -espectrina y citokeratina 8 observándose la distribución de las costámeras a lo largo de la línea Z y M (Figura 1.5A, B).



C

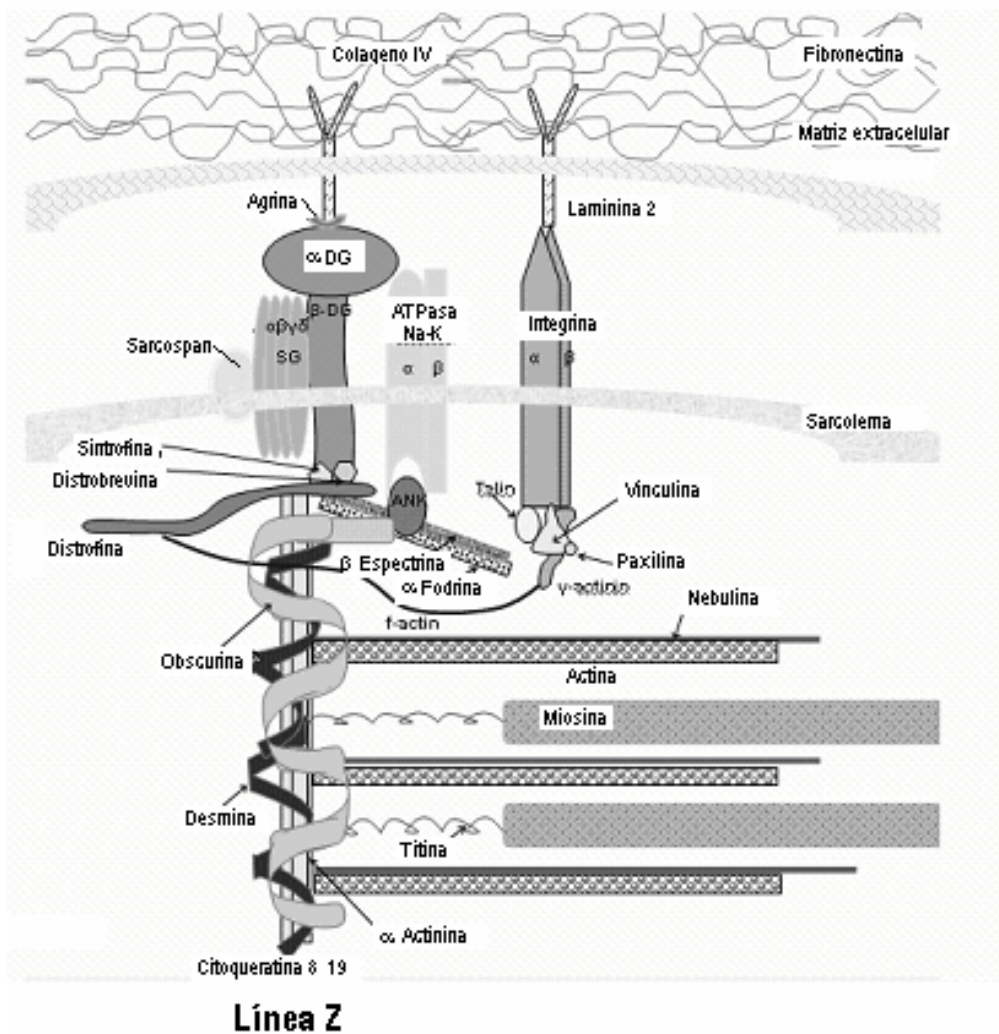


Figura 1.5 Localización de las costámeras en músculo esquelético rápido de TA de rata. A) En el sarcolema se muestra la distribución de las costámeras sobre la línea M, los discos Z y a lo largo del eje longitudinal. (Bloch et al, 2002) B) Células esqueléticas marcadas con anticuerpos para la α -actinina y la citoqueratina 8. C) Modelo de las costámeras sobre la línea Z. Las dimensiones de las proteínas no es a escala (modificado de Bloch, et. al., 2004; Ervasti et. al., 2003; Jaalouk et.al. 2009).

Posiblemente la laminina que se encuentra en la matriz extracelular también esté unida al sarcolema a través del complejo de proteínas transmembranales compuestas por la distrofina (Hoffman et. al. 1987) y sus proteínas asociadas (CDG) (Ohlendieck et. al., 1991). La distrofina y sus proteínas asociadas son el distroglicano (α -y β -distroglicano), el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan, y la sintrofina están presentes a lo largo del sarcolema, pero enriquecidas en los discos Z (Williams y Bloch, 1999), y todo el complejo está unido a la actinina.

La asociación que tiene la β -espectrina con la actina intracelular e integral además de la anquirina, la ATPasa de Na-K y los canales Na voltaje-dependientes sugieren que su función principal es la de mantener la organización de las proteínas de la membrana en las costameras más que proteger a la membrana de la tensión (Porter et. al., 1992).

La proteína mas estudiada es la distrofina, proteína faltante en los pacientes con Distrofia muscular de Duchenne (Claffin y Brooks, 2008). Se cree que la función de la distrofina junto con sus proteínas asociadas es proteger al sarcolema contra daños durante la contracción muscular. La distrofina y sus proteínas asociadas son el distroglicano, los sarcoglicanos, la distrobrevina y la sintrofina. Las espectrinas también son componentes importantes de las costameras porque anclan a través de una proteína de unión, llamada anquirina, a las proteínas que son esenciales para la actividad eléctrica de la fibra muscular, incluyendo la de Na, K-ATPasa, y muy probablemente, el canal de sodio dependiente de voltaje. La espectrina y el complejo de la distrofina interactúan

directa o indirectamente (Williams y Bloch, 1999). El gen de la distrofina es el más grande conocido en el ser humano (2.5 Mb), con una contribución de aproximadamente 0.1% del genoma humano (López et. al., 1997; Malcolm, 2001).

La distrofina es un elemento central en el complejo distrofina-glicoproteína. Este complejo tiene como función anclar al citoesqueleto con la matriz extracelular. La distrofina sirve como ancla y es capaz de absorber la tensión mecánica que las células musculares sufren en condiciones pasivas (succión sobre el sarcolema tal y como se hizo en el presente estudio) y activas (con cada contracción). La proteína β -dystroglicano es una proteína transmembranal que se une al extremo carboxilo de la distrofina. La distrofina tiene homologías en su extremo carboxilo con la utrofina y distrobrevina. Tanto la utrofina como la distrobrevina forman parte del complejo distrofina-glicoproteína. La desmina, con sus proteínas asociadas como las queratinas, la sinemina y la paranemina forman los filamentos intermedios en las líneas Z (Wieneke, 2000).

En el músculo esquelético, la estructura extracelular que interactúa más íntimamente con el sarcolema es la lámina basal. Esta es una proteína que se encuentra aproximadamente a 25 nm de la membrana plasmática. La laminina, el colágeno IV y la fibronectina son un componente importante de la lámina basal de todas las células musculares esqueléticas.

A continuación se presenta una descripción de las principales proteínas que conforman a las costameras.

Proteínas sarcolemales Se definen como aquellas proteínas que conectan a las miofibrillas (filamentos de actina y miosina) con el sarcolema y son: la α -actinina, la α -fodrina, la β -espectrina, la anquirina, las citoqueratinas, la desmina, la distrofina, el NOS, la oscurina, la sinemina, la sintrofina, la vinculina. Y los complejos proteicos sarcolemales que conectan al citoesqueleto con la membrana basal: las integrinas y el complejo distrofina-glicoproteína (CDG), la agrina, la caveolina, la disferlina, los dystroglicanos, la ATPasa de Na-K, los sarcoglicanos y el sarcospan (Granger y Lazarides, 1999; Williams y Bloch, 1999; Bloch y Gonzalez-Serratos, 2003)

α -actinina. Es un homodímero con peso molecular de 97 kDa. Se localiza solamente en los discos Z, formando una fuerte unión con la F-actina ya que ancla los filamentos de actina (Williams y Bloch, 1999).

β-espectrina. Es una proteína con peso molecular de 253 kDa. Es un complejo presente en las costámeras que está formado por la asociación de la actina intracelular, la anquirina, la bomba de ATPasa de Na-K y los canales de Na voltaje dependiente. Algunas funciones de este complejo son las de mantener la organización de las proteínas integrales en los sitios de las costámeras y proteger a la membrana plasmática del esfuerzo mecánico que se lleva a cabo durante la contracción muscular. Interviene en la actividad eléctrica de la fibra muscular mediante la anquirina, la bomba ATPasa de Na-K y probablemente el canal de Na voltaje dependientes (O'Neill et. al., 2002).

Anquirina. Es una proteína de 463 kDa. Proteína que une los canales iónicos y las adhesiones celulares con la espectrina. Se encuentra agrupada en la unión neuromuscular y los segmentos iniciales de axones. Une la β-espectrina con los segmentos iniciales del axon.

Citoqueratinas. En el músculo esquelético se ha encontrado que los filamentos de citoqueratina 8 (55 kDa) y 19 (40 kDa), unen a las costámeras en los discos Z y la línea M con la distrofina. Se piensa que las citoqueratinas y los microfilamentos de γ-actina son responsables de mantener a las costameras alineadas con los sarcómeros cercanos y así transmitir la fuerza lateral (O'Neill et. al., 2002).

Desmina. Es una proteína de 53 kDa. Es la mayor proteína de los filamentos intermediarios del músculo esquelético, junto con la paramenina, la sinemina, la sincoilina y la desmuslina, rodean a los discos Z. Su función es ayudar a la organización de las miofibrillas y mantener la integridad estructural y mecánica al igual que la transmisión de fuerza (Sam et. al., 2004; Granger y Lazarides, 1999).

Sintrofina. Tiene un peso molecular de 58 kDa. Interactúa directamente con la distrofina, se une a la sintetasa del eNOS, calmodulina y el complejo distrofina-glicoproteína. Une los canales iónicos y las proteínas señalizadoras con el citoesqueleto (Adams, 2000).

Vinculina. Tiene un peso molecular de 117 kDa. Está localizada en las costámeras, esta asociada con la α -actinina, la talina y las moléculas señalizadoras en las adhesiones focales. Forma una unión física entre el interior de la célula muscular y la matriz extracelular así como también estabiliza la asociación del sarcolema con la matriz extracelular durante el proceso de contracción muscular (Shear y Bloch; 1985).

Complejo distrofina-glicoproteína (CDG). El CDG es un gran complejo de proteínas oligoméricas en el sarcolema del músculo esquelético. Une al citoesqueleto con la membrana basal. El CDG se compone de dos proteínas integrales de membrana y periféricas, y proporciona una conexión estructural entre la membrana basal y el citoesqueleto de actina. Dentro de sus funciones está la de proveer una conexión estructural y una fuerte unión mecánica entre la membrana basal y el citoesqueleto, así como también tiene un papel en la transducción de señales y sobre todo en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la membrana. El CDG se agrupa en tres subcomplejos, las subunidades α - y β - distroglicano, el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan, y la sintrofina, componentes del citoesqueleto de la distrofina y la distrobrevina (Matsumura y Campbell, 1994; Lapidus et. al., 2004).

Integrina. Forma parte de una gran familia, en los receptores de la superficie celular, que median las interacciones de la matriz extracelular con el citoesqueleto, además de ser la unión con

la fibronectina, vitronctina, el colágeno y la laminina. La integrina esta presente en el sarcolema, la unión neuromuscular, la unión miotendinosa y las costámeras del músculo esquelético, juega un papel importante en la diferenciación muscular. La integrina $\alpha 7\beta 1$ es un receptor importante en la migración de mioblastos. Actualmente se han identificado 18 subunidades α y 8 subunidades β (Mayer, 2003).

Sarcoglicano. Es una proteína transmembranal con un solo dominio. Está compuesto de múltiples subunidades: α (50 kDa), β (43 kDa), γ (35 kDa), δ (35 kDa), ϵ (45 kDa) y ζ , las cuales se glicosilan y se organizan en forma de heterotetrámeros (β y δ , α, γ y ϵ). En el músculo esquelético están presentes los sarcoglicanos α , β , γ y δ , que juegan un papel importante en la transmisión de fuerza a través del CDG (Ervasti et. al., 1990; Straub et. al., 1997)

Sarcospan. Es una proteína con un peso molecular de 25 kDa, pertenece a la familia del tetraspan. Su isoforma 1 es la que está presente en el músculo esquelético y cardiaco, aunque se ha predicho la existencia de 3 isoformas más. Se localiza en el sarcolema sobre la unión neuromuscular y miotendinosa. Es una proteína integral en el CDG (Crosbie et. al., 1997).

Proteínas costaméricas extracelulares

La membrana basal o matriz extracelular rodea a las fibras musculares y su función principal es mantener la integridad del músculo, está formada de proteínas y carbohidratos. Se divide en dos: la lámina basal (interna), relacionada íntimamente con el sarcolema y la lámina fibrilar (externa): la primera está compuesta de colágeno no fibroso, especialmente de colágeno IV, glicoproteínas sin colágeno como la laminina y los proteoglicanos mientras la segunda contiene colágeno. El espesor aproximado en el músculo esquelético es de 25 nm a partir de la membrana plasmática. Las células satelitales se alojan entre la fibra muscular y la lámina basal. Dentro de las proteínas extracelulares que conforman a las costameras están: el colágeno IV, la entactina, la fibronectina y la laminina (Sanes, 1982).

Entactina. Proteína con peso molecular de 150 kDa localizada en la membrana basal. Se une con la laminina y al colágeno IV formando una relación muy estrecha con ambos (Campbell y Stull, 2003).

1.2.2.2 Membranas biológicas

Las membranas biológicas son superficies dinámicas de aproximadamente 60 a 90 Å de grosor, son semipermeables y flexibles, sirven para separar al citoplasma del medio ambiente extracelular. Las membranas son asimétricas, tanto la cara interna como externa poseen diferentes proteínas y tienen diferentes propiedades; son ricas en fosfolípidos, los cuales espontáneamente forman estructuras de doble capa en el agua, mismos que tienen una región polar hidrofílica y una región no polar hidrofóbica. En la membrana doble se encuentran proteínas transportadoras que comunican al citoplasma con el medio exterior (proteínas integrales); otras se incrustan fuera o solamente dentro de la membrana (proteínas periféricas o submembranales). La cantidad de las proteínas varía en base a la función de la membrana, pero constituyen ~50% de la masa de la membrana. Las proteínas membranales tienen diversas funciones como por ejemplo: las moléculas de adhesión celular, que fijan la célula con las células vecinas o con la lámina basal; otras funcionan como bombas que transportan iones de manera activa a través de la membrana; otras actúan como transportadores permitiendo el paso de iones hacia el interior o exterior de la célula; también hay otras que son receptores a los cuales se les unen los ligandos o moléculas mensajeras; otras actúan como enzimas al catalizar reacciones en la superficie de la membrana. Las proteínas y los lípidos de las membranas pueden difundirse lateralmente dentro de la membrana, dándoles las propiedades de un mosaico fluido (Alberts, 2007).

Las estructuras más susceptibles a los daños ocasionados por la acción contráctil, son las membranas que rodean a las células. Existen tres sistemas principales de las membranas que son esenciales para a la función normal del músculo esquelético. La membrana plasmática o sarcolema, que define el interior y el exterior de la fibra, y media la transmisión de la fuerza generada durante la contracción. Los túbulos transversales que forman una red reticular. Y, el retículo sarcoplásmico que forma una red de túbulos de membrana alrededor de cada sarcómero con los almacenes intracelulares de iones de calcio.

1.2.2.2.1 Sarcolema

La célula muscular está rodeada por una membrana llamada sarcolema (membrana plasmática del músculo). Ésta presenta finas invaginaciones tubulares (túbulos transversos o túbulos T) distribuidas regularmente a lo largo de la fibra muscular y hasta el centro de las células musculares.

El sarcolema juega un papel central en la estructura y funcionamiento del músculo esquelético (Engel y Franzini-Armstrong, 1994). Está directamente implicado en la transmisión sináptica, la propagación del potencial de acción, el acoplamiento excitación-contracción y en la estructura del músculo. La importancia biológica de la membrana basal-sarcolema-citoesqueleto del músculo esquelético se tiene por el número de enfermedades musculares hereditarias causadas por mutaciones en los componentes de la membrana basal, o citoesqueleto, o los complejos de proteínas del sarcolema que enlazan la membrana basal con el citoesqueleto (Barret, 2010).

1.2.2.2.2 Sistema sarcotubular

El sistema sarcotubular está formado por un sistema T y dos cisternas terminales de retículo sarcoplásmico ubicadas al lado del sistema T (Figura 1.6).

El potencial de acción del sarcolema viaja a lo largo de las invaginaciones periódicas del sarcolema hacia dentro de la célula muscular lo que lleva a la activación y contracción de toda la sección transversal de la célula. Estas invaginaciones del sarcolema forman una red de tubos transversalmente orientados con respecto al eje largo de la fibra que se repiten en cada sarcómero, formando una red de tubos transversos llamado el sistema-T. Los tubos transversos están abiertos al espacio extracelular y conducen rápida y profundamente hacia el interior de la célula muscular

el proceso de excitación de la membrana superficial. Las membranas de los tubos-T generan potenciales de acción tubulares los cuales se propagan hasta el centro de la célula. Los tubos transversos son flanqueados a cada lado al nivel de cada miofibrilla por extensiones del sistema retículo sarcoplásmico (RS), que son las cisternas terminales (CT). Un tubo transverso y las dos membranas CT que lo flanquean forman las tríadas (Figura 1.6).

Las CT, en reposo, están llenas de calcio almacenado en una concentración mucho más alta que la del citosol (~ 200 veces) siendo los almacenes intracelulares de Ca^{2+} . En las CT existen estructuras electro-densas llamadas pies, los cuales están vinculados con la transmisión de la señal entre la despolarización de la membrana de tubos-T y de la CT. Esta señal acciona la salida de Ca^{2+} de la CT del RS. El bloqueador orgánico de los canales de calcio, la dihidropiridina, bloquea la contracción; y en la porción frente a los pies se encuentran proteínas muy afines a la dihidropiridina, siendo los receptores de dihidropiridina (RDHP). Los RDHP son los sensores tubulares del voltaje de la membrana ya que detectan el cambio del voltaje en las membranas tubulares. Los receptores de rianodina traducen el cambio de voltaje a la membrana tubular-T a una señal que es transmitida a través de los pies hacia la membrana del RS.

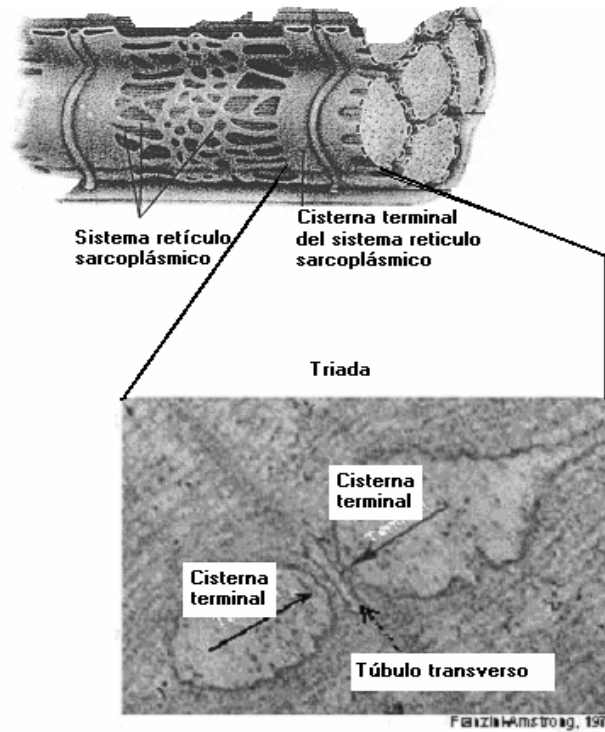


Figura 1.6 Conformación de la triada, dos cisternas terminales y un sistema-T, en una fibra muscular esquelética (microfotografía de Franzini-Armstrong, 1970).

1.2.3 Función muscular

El músculo es un motor muy eficiente. La movilidad biológica es causada por la activación de motores biológicos que son las máquinas moleculares que convierten la energía química derivada de la hidrólisis del ATP en energía mecánica que se puede manifestar como trabajo mecánico externo, trabajo interno y, más a menudo, como ambos. Esta energía se utiliza para accionar la movilidad de la máquina entera. El motor biológico es la miosina, que conduce a la contracción de los músculos.

La cantidad de fuerza generada por la célula muscular es determinada por factores como: el número de fibras musculares que una unidad motora inerva (la tasa de inervación), la sección transversal de esas fibras y la fuerza desarrollada por unidad de área (fuerza específica). La dimensión de una motoneurona es directamente proporcional al desarrollo de fuerza que se le requiere al músculo al que pertenece e inversamente proporcional al componente de precisión, es decir, cuanto mayor sea el componente de precisión que se le requiere al músculo, mas pequeña

será la motoneurona, mientras que cuanto mayor sea la necesidad de fuerza requerida al mismo músculo, la motoneurona será mas grande. Por ejemplo, una gran motoneurona inerva al glúteo, mientras que una motoneurona de dimensiones pequeñas inerva al ojo. Lo anterior es conocido como el Principio de Henneman (Henneman *et. al.*, 1974).

1.2.3.1 Tipos de contracciones

Existen tres tipos de contracciones que un músculo puede realizar. Si la longitud del músculo no cambia durante su activación, la acción se llama isométrica o estática. Aquellas contracciones en las que las fibras musculares además de contraerse, modifican su longitud se llaman isotónicas, y se dividen en dos (Dvorkin *et. al.*, 2010):

- Concéntrica. Los músculos se acortan y ocurre un movimiento de la articulación con desarrollo de tensión
- Excéntrica. Cuando la resistencia externa excede la fuerza que es capaz de desarrollar el músculo, por lo que éste se estira mientras está desarrollando tensión
- Isométrica. Cuando un músculo genera fuerza y tiende a acortarse, pero no puede superar la resistencia externa; como resultado no se desarrolla trabajo externo.

1.2.3.2 Acople excitación-contracción en las fibras musculares

El acople excitación-contracción es el mecanismo mediante el cual un estímulo en el músculo inicia con el cambio de polaridad en la membrana de la célula, que conduce a la liberación masiva de Ca^{2+} del RS causando un aumento intracelular de Ca^{2+} y la interacción de actina-miosina.

Cuando llega una señal al cerebro y como consecuencia se requiere de movimiento, la señal es procesada por el sistema nervioso central dando por resultado la activación de neuronas motoras. Los potenciales de acción generados por las neuronas motoras viajan a lo largo de los nervios correspondientes hasta alcanzar las terminaciones nerviosas. Cada terminal del nervio se agranda en una estructura que forma el botón terminal. El botón terminal penetra a los surcos formados por el sarcolema y se aproxima sin tocarla a una estructura especializada del músculo, la placa neuromuscular. Los potenciales de acción del nervio abren los canales para calcio dependientes de voltaje del

botón terminal iniciando un flujo de entrada de Ca^{2+} al botón terminal que causa la liberación de acetilcolina (ACh). La ACh difunde a través del espacio entre el botón terminal y la placa neuromuscular ocasionando la despolarización de ésta última creando el potencial de placa terminal. Si el potencial de placa es de magnitud suficiente para alcanzar el umbral de la fibra, se genera un potencial de acción en el sarcolema circundante que se propaga a lo largo de toda la membrana de la superficie del músculo. Ésta depolarización abre nuevos canales dependientes de voltaje, propagándose así el potencial de acción por toda la membrana, incluyendo los túbulos T (TT). Los TT conectan directamente con el retículo sarcoplásmico, de forma que cuando los TT se despolarizan se abren canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, el incremento de Ca^{2+} mioplásmico inicia la interacción de la miosina con la actina que lleva a la contracción. El Ca^{2+} es recapturado por la bomba para calcio ATP dependiente, localizada en el collar fenestrado del sistema retículo sarcoplásmico lo que hace que la concentración mioplásmica del Ca^{2+} disminuya a los niveles de reposo y la célula muscular se relaje. El Ca^{2+} se difunde a la cisterna lateral donde se acumula y queda listo para salir de nuevo (Figura 1.7).

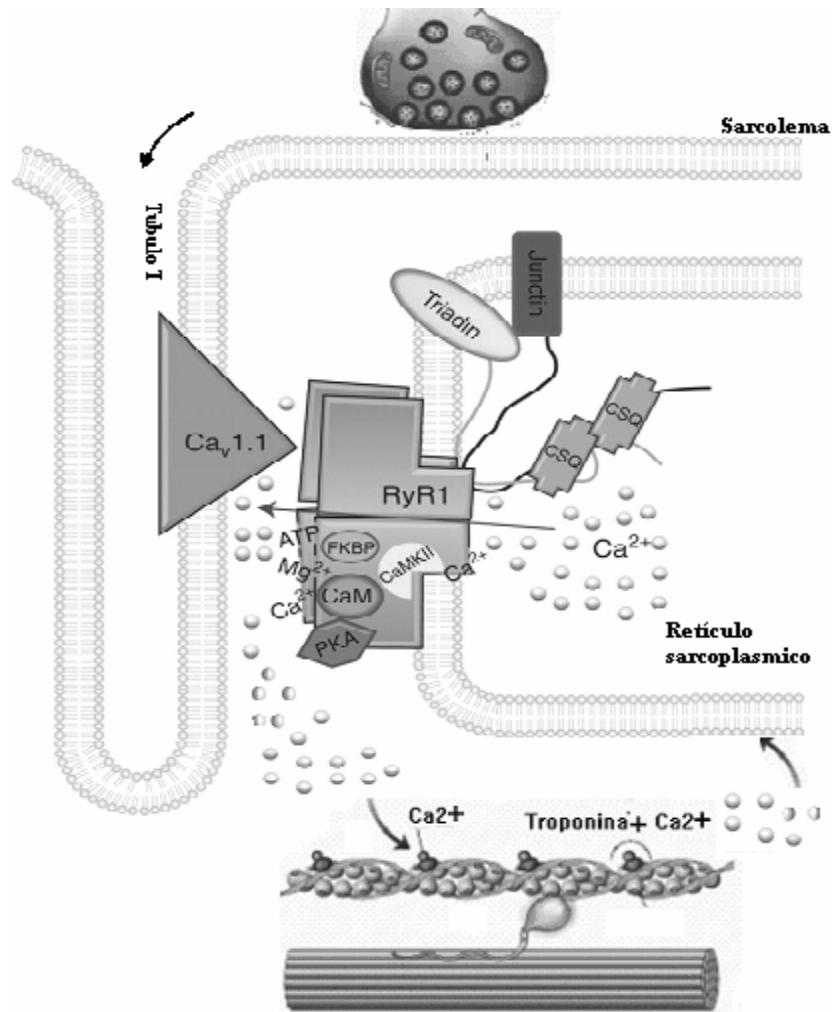


Figura 1.7 Acople excitación-contracción de las células esqueléticas (Cav1.1. canal de Ca^{2+} tipo L; PKA. Proteína cinasa A; CaM. Calmodulina; CSQ. Calsequestrina; RyR. Receptor de rianodina; FKBP. Proteínas de unión) (modificado Lanner et. al., 2010).

1.2.3.3 Teoría del deslizamiento

La teoría del deslizamiento propuesta por Huxley y Niedegerke (1954) y Huxley y Hason (1954) propone que un músculo se acorta o se alarga debido a que los filamentos de miosina se deslizan sobre los filamentos de actina sin cambiar su longitud. En estado relajado, el sarcómero tiene una banda I y A cuya longitud está determinada por la extensión de los filamentos gruesos. Cuando la contracción tiene lugar, el sarcómero se acorta (Figura 1.8). Las líneas Z en cada extremo se aproximan, haciendo que las bandas H e I, casi desaparezcan.

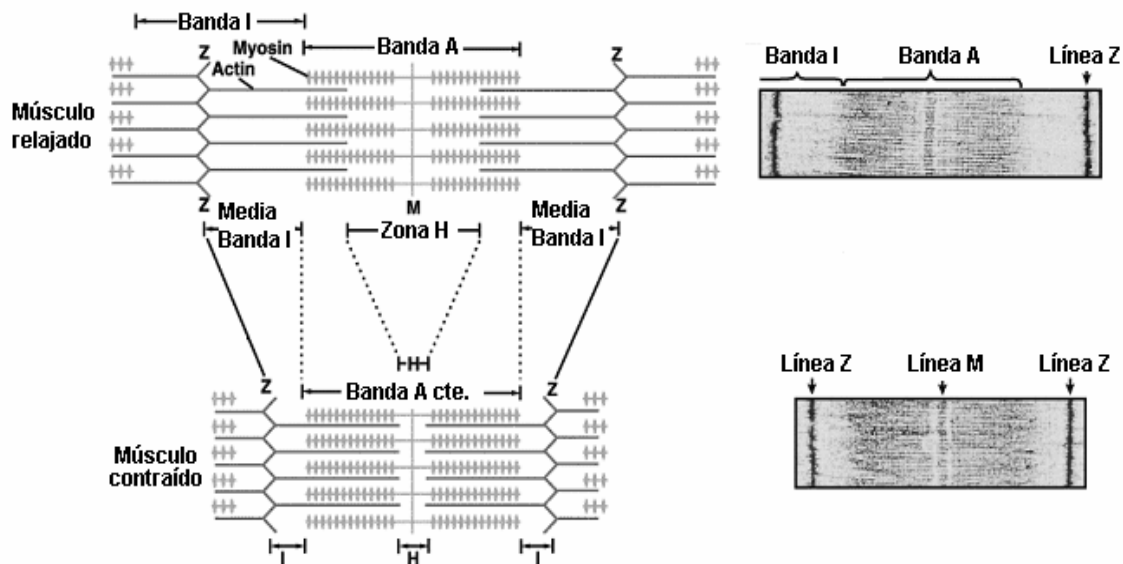


Figura 1.8 Cambios en la longitud del sarcómero durante la contracción. Cuando el sarcómero se contrae los filamentos gruesos y los finos no modifican su longitud, la banda A permanece constante, pero la banda H e I se acortan.

Cuando las células musculares son estiradas pasivamente de una longitud de sarcómero (LS) de 2.0 a 3.0 μm , la banda I cambia su longitud en la misma proporción en la que cambia la LS. La zona de H cambia igualmente en la longitud, haciéndose más grande a una LS más grande. Cuando las células del músculo se estimulan, durante el acortamiento, la banda I y la zona H disminuyen en longitud en la misma proporción que el sarcómero disminuyó en su longitud. Hay otras dos partes que permanecen constantes durante el cambio de la LS: la banda A y la distancia del borde H a H de un sarcómero al adyacente pasando por la membrana Z que hay entre ambas.

Se ha estudiado la relación entre la LS y la fuerza de la contracción que se produce cuando las células de los músculos son estimuladas a distintas LS obteniendo la curva de longitud-tensión que apoya la Teoría de los filamentos deslizantes (Figura 1.9). Cuando el músculo se encuentra en estado de reposo, los filamentos delgados y gruesos se superponen por completo y se puede formar un número máximo de puentes cruzados. Cuando se produce el estiramiento del músculo, disminuye el grado de superposición entre los filamentos delgados y gruesos, disminuyendo el número de puentes cruzados. Esto reduce la capacidad del músculo para generar tensión. Y cuando el músculo está contraído, los filamentos delgados se superponen

por completo, pero los filamentos de cada extremo del sarcómero se tocan en el centro de la banda A y cada uno interfiere con el movimiento del otro. Como consecuencia, disminuye el desarrollo de la tensión (Figura 1.10).

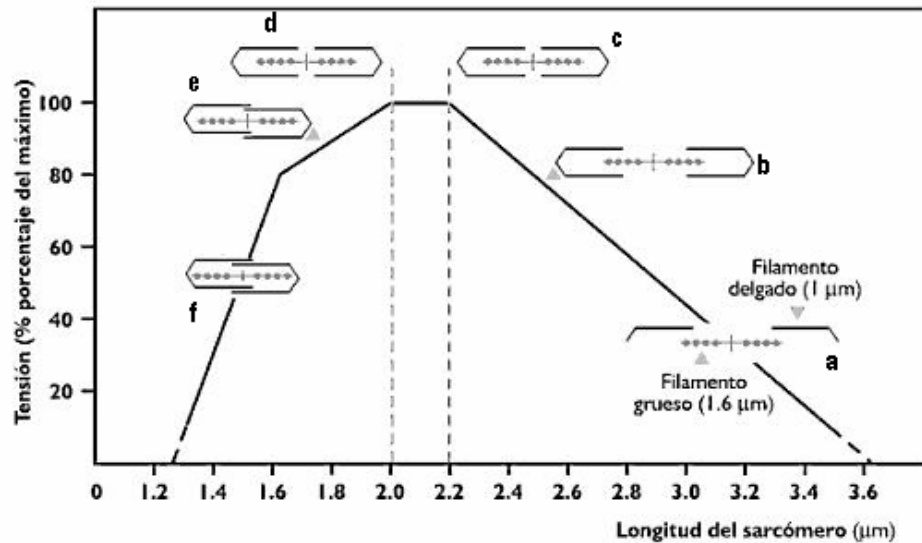


Figura 1.9 Relación longitud-tensión en células musculares esqueléticas aisladas (Modificada de Gordon et. al., 1966)

Cuando una célula muscular se estira a más de 3.65 μm/sarcómero no hay traslape entre los filamentos de miosina y de actina, y no se desarrolla fuerza alguna (Figura 1.9a). La fuerza que se desarrolla entre 3.65 a 2.25 μm/sarcómero debe aumentar linealmente con una relación inversa a la longitud de los sarcómeros (Figura 1.9a). Cuando los sarcómeros tienen un espacio de 2.25 μm hay un traslape máximo (sin doble traslape) entre los filamentos delgados y gruesos. La fuerza máxima se debe desarrollar a este espacio sarcomérico (Figura 1.9c). Entre 2.25 y 2.0 μm/espacio sarcomérico no hay un aumento ni disminución del número de los puentes de miosina que interactúan con la actina durante la activación, por lo tanto, el desarrollo de la fuerza debe ser igual en ambas longitudes sarcoméricas. Esta longitud se define como la longitud óptima (L_o) de desarrollo de fuerza (Figura 1.9d). Entre 2.0 y 1.6 μm/sarcómero el traslape de los filamentos es doble. La fuerza que se desarrolla decrece en la misma proporción en que disminuyen las longitudes de los espacios sarcoméricos (Figura 1.9e).

La base molecular de deslizamiento de los filamentos se lleva a cabo por los puentes cruzados que forman las cabezas globulares de la miosina con los monómeros de actina. La miosina convierte la energía química unida a ATP en energía mecánica para producir el movimiento. Cada molécula de miosina actúa como una ATPasa, ya que lo hidroliza, formándose ADP, fosfato inorgánico (Pi) y liberando energía. El ciclo de fijación y rompimiento de los puentes cruzados se ilustra en la Figura 1.10. La actina y la miosina en ausencia de ATP están unidas y el músculo se pone rígido (Figura 1.10a). La presencia de una molécula de ATP hace que el complejo actina-miosina se disocie (Figura 1.10b). Se produce la hidrólisis de ATP en la cabeza de miosina, formándose ADP y Pi que permanecen unidos a la cabeza de miosina (Figura 1.10c). La energía liberada de la hidrólisis del ATP se asocia con un cambio de configuración de la miosina haciendo posible la unión de la cabeza de miosina con un nuevo monómero de actina (Figura 1.10d). El ADP y el Pi siguen unidos a la cabeza de miosina. La liberación de Pi provoca que la cabeza de miosina retorne a su posición inicial provocando el deslizamiento del filamento de actina hacia el centro del sarcómero (Figura 1.10e). Cuando el ADP se disocia del complejo, la cabeza de miosina alcanza su posición final y cesa el desplazamiento del filamento delgado (Figura 1.10f). Esto es debido a que la actina y la miosina se unen formando un complejo estable y adoptan la posición original del ciclo de la contracción. El nuevo complejo solo puede disociarse con la unión de una molécula de ATP a la cabeza de miosina.

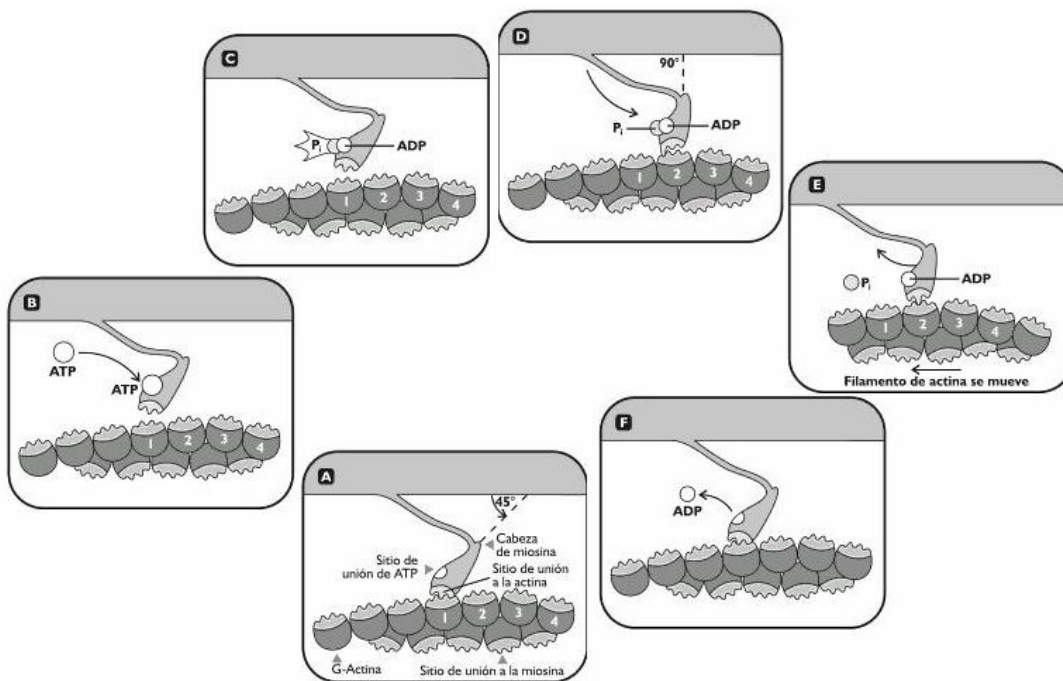


Figura 1.10 El ciclo de los puentes cruzados en la contracción del músculo esquelético.

1.2.4 Transmisión de fuerza a través del sarcolema

La fuerza generada durante la activación de puentes cruzados debe ser transmitida a lo largo del sarcolema, a través de los tendones y a los huesos para realizar un trabajo útil. Las miofibrillas individuales están unidas entre sí mediante proteínas de unión del citoesqueleto, incluyendo la desmina, la plectina y la sinemina. La fuerza generada en el aparato contráctil no solo es transmitida longitudinalmente de un sarcómero a otro sarcómero, sino también lateralmente, entre los sarcómeros de las miofibrillas adyacentes. Las miofibrillas, que son los elementos longitudinales que transmiten la fuerza en el mioplasma terminan en la unión miotendinosa. Las uniones laterales anclan al sarcolema en sitios especializados de transmisión de fuerza denominados costameras. Las costameras se encuentran de manera periódica a lo largo del sarcolema, sobre las líneas M y las líneas Z de las miofibrillas superficiales.

La unión miotendinosa es una membrana especializada que transmite gran cantidad de fuerza generada en las miofibrillas a la fibra, de ahí al tendón y después al hueso. Las miofibrillas están unidas a la lamina basal de la unión miotendinosa mediante complejos similares a las adhesiones focales. Estas conexiones son mediadas a través de proteínas como la talina, la vinculina, la distrofina y la integrina $\alpha 7\beta 1$ al sarcolema, así como a través de la laminina, el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. La fuerte conexión entre la fibra muscular y el tendón se debe al alto grado de dobleces internos de la membrana plasmática en la unión miotendinosa. Aunque la mayor parte de la fuerza generada durante la contracción muscular es transmitida al tendón; el resto de la fuerza generada es transmitida lateralmente a través del sarcolema por las costameras (Monti et al., 2001).

1.2.4.1 Transmisión de fuerza lateral

Es ampliamente aceptado que la mayor parte de la fuerza contráctil es transmitida en serie a través de los sarcómeros a la unión miotendinosa y a los tendones; sin embargo una fracción menor de fuerza es transmitida lateralmente a través del sarcolema (Bloch y González-Serratos, 2003; Monti et al., 2001). Es importante entender porque los defectos en el sarcolema así como las mutaciones en las proteínas costaméricas y en el citoesqueleto causan muchas de las distrofias musculares (Spence et. al., 2002).

Street (Street, 1983) fue la primera investigadora en estudiar la transmisión de fuerza lateral en rana midiendo la fuerza producida durante la contracción muscular, encontrando que las fibras musculares eran capaces de generar fuerza de hasta ~75%. También midió la fuerza tetánica en una y en varias células encontrando que durante la fuerza de contracción, al menos 80% de la fuerza podía ser transmitida lateralmente. Y evidenció la presencia de estructuras que anclaban al sarcolema con el aparato contráctil tal que se formaban crestas y valles.

En 1964, Podolsky demostró que el sarcolema estaba unido a las miofibrillas mediante unas estructuras capaces de anclar al sarcolema en alineación con la línea Z, lo que impedía la distensión irregular del sarcómero.

En 1984 Proske y Morgan (Proske y Morgan, 1984) mostraron la existencia de la transmisión de fuerza lateral en el músculo soleus de gato. Ellos observaron que la tensión en una mitad de músculo con tendón y otra mitad sin tendón era constante, concluyendo que la tensión generada por las fibras debía ser integrada al músculo antes de llegar al tendón, siendo a través de las conexiones laterales entre las fibras con su tejido conectivo.

Experimentos realizados en 1993 por Law y Lightner (Law y Lightner, 1993) en fibras de rana encontraron que existían ciertas estructuras regulares alineadas con los sarcómeros que mantenían unidos a los elementos contráctiles con el sarcolema. Estos investigadores estiraron a las fibras musculares en una solución sin cationes divalentes, lo que debilitó a la unión miotendinosa. Luego, estiraron a la fibra hasta un punto previo al rompimiento de la unión, encontrando que durante el estiramiento los sarcómeros permanecían estirados. De tal forma, que sugirieron que los sarcómeros eran mantenidos en esa posición por su asociación lateral con el sarcolema.

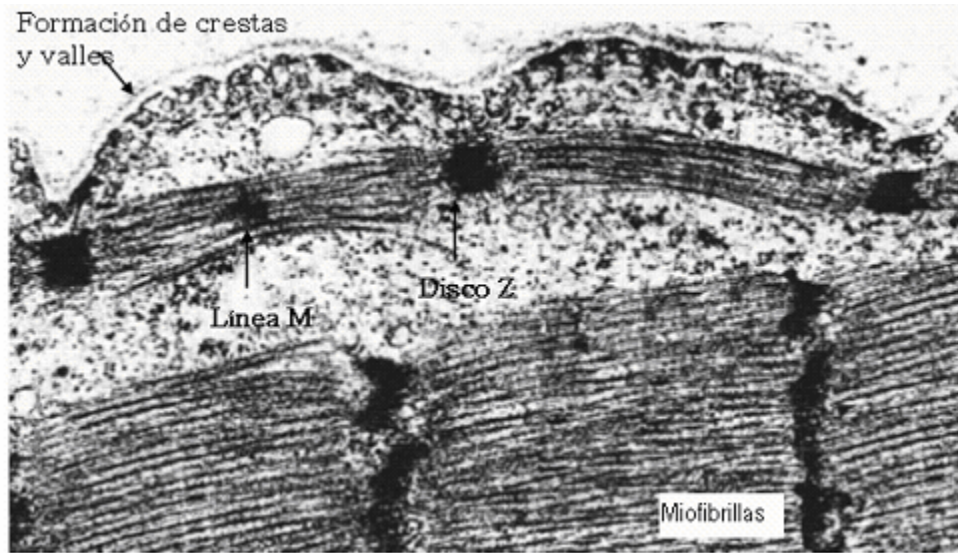


Figura 1.11 La formación de ondulaciones durante la contracción muscular, $LS= 1.7\mu\text{m}$. (tomado de Reed et. al., 2004).

Street y otros investigadores mostraron que existen elementos estructurales que unen al sarcolema con la línea Z y la línea M por debajo de las miofibrillas. Estas conexiones están hechas por filamentos intermedios y probablemente también por filamentos de actina al nivel de las líneas Z (Craig y Pardo, 1983; Rybakova et. al., 2000). Estudios ultra estructurales han hecho presente la presencia de acumulaciones de proteínas en los sitios de unión de las miofibrillas con el sarcolema (Franzini-Armstrong, 1979; Shear y Bloch, 1985) y demostraron que éstas acumulaciones están unidas a la línea Z y M de las miofibrillas mas superficiales, estos elementos de unión son las costameras.

1.2.4.2 Tejido conectivo como elemento elástico

La fuerza desarrollada por las proteínas contráctiles se transmite a través de la membrana superficial o sarcolema, a los tendones y de los tendones a los huesos antes de que se manifieste como una fuerza externa o movimiento. El sarcolema y los tendones son tejidos elásticos, lo que implica que la fuerza desarrollada por las proteínas contráctiles no es ejercida directamente sobre los huesos, sino a través de varios elementos elásticos que están en serie entre las proteínas contráctiles y los huesos. Por lo tanto, el desarrollo verdadero de la fuerza del material contráctil la miosina y la actina no puede ser medida directamente.

1.2.5 Distrofias Musculares relacionadas con las costameras

Las distrofias musculares son desordenes genéticos caracterizados por la pérdida progresiva de los músculos esqueléticos (Tabla 1.3). Un gran número de las distrofias musculares son causadas por el debilitamiento de las conexiones entre el citoesqueleto con el sarcolema mediante estructuras mecánicas y alineadas de manera continua a lo largo del sarcolema de la fibra muscular llamadas costameras, por lo que los daños en el sarcolema pueden estar relacionados con una disminución en la transmisión de fuerza lateral a través del sarcolema.

La distrofia muscular de Duchenne, es la forma más común de distrofia muscular; es un trastorno ligado al cromosoma X. La distrofia muscular de Becker es causada por anomalías en la calidad o la cantidad del gen de la distrofina. Estos tipos de distrofia se caracterizan por la pérdida progresiva de los músculos esqueléticos, donde los músculos de la cintura muestran debilidad desde los 5 años de edad, seguido por la incapacidad de caminar a los 8-12 años. Otros hallazgos incluyen niveles altos de la creatinina (Lovering et. al., 2005). A nivel celular, los cambios incluyen la ausencia de distrofina en la membrana de las fibras musculares, aumento de tejido adiposo y conectivo entre las fibras del tejido muscular, aumento de la variabilidad en el tamaño de las fibras musculares, infiltración de células inflamatorias, y los núcleos en una posición céntrica; que son indicativos de degeneración y la regeneración de las fibras musculares (Heydemann et. al., 2007; Lovering et. al., 2005). La distrofina proporciona estabilidad mecánica al sarcolema y es probable que participe en la transmisión de la fuerza entre el aparato contráctil y la matriz extracelular, que envuelve la fibra y está conectado con el tendón.

Del mismo modo, las mutaciones en las proteínas del citoesqueleto como la desmina, titina y la miosina, que son componentes importantes del sarcómero, dan como resultado sarcómeros desorganizados, alteración en la mecánica celular como la disminución en la fuerza (Anderson et. al., 2002; Balogh, et. al., 2005; Bär et. al., 2004).

Tabla 1.3 Miopatías humanas asociadas con mutaciones que alteran a las proteínas sarcolemales. (Lovering et. al., 2005)

Enfermedad	Proteína ausente o deficiente
Distrofia de Duchenne/Becker	Distrofina
LGMD1C	Caveolina-3
LGMD2A	Calpaina-3
LGMD2B/miopatía de Miyoshi	Disferlina
LGMD2C	γ -sarcoglicano
LGMD2D	α -sarcoglicano
LGMD2E	β -sarcoglicano
LGMD2J	Titina
CMD deficiente de merosina	Laminina $\alpha 2$
Epidermolisis bulosa simple	Plectina
Emery-Dreifuss	Emerina
Miopatía relacionada a la desmina	Desmina

1.2.5.1 Modelos murinos

Los modelos animales son una fuente invaluable para tratar de entender como ocurren los procesos biológicos en el humano cuando hay mutaciones genéticas. En el presente trabajo se emplearon los modelos animales con distrofia muscular de Duchenne y la desminopatía.

El ratón sin distrofina o *mdx* carece por completo de la distrofina por una mutación en el axón 23 del gen 8. La duración de vida de este ratón no se reduce al ser comparada con el ratón normal. Los músculos de estos ratones muestran hipertrofia, las células musculares presentan necrosis entre las tres y las cuatro semanas de vida, y la presencia de fibrosis es mayor en los músculos de la pantorrilla (Dudley et. al., 2004; Blake et. al., 2002). Las células musculares esqueléticas de ratón *mdx* presentan gran desorganización longitudinal y transversal en las costámeras; mismo patrón que se presenta en humanos (Figura 1.12). El ratón *mdx* se usó como modelo para la enfermedad de la distrofia muscular de Duchenne en humanos causando inestabilidad directa en el sarcolema (Hoffman et. al., 1987; Sicinski et. al., 1989) debido a que ésta proteína, que forma parte de las costameras, protege al sarcolema contra el daño inherente ocasionado por la contracción muscular (Williams y Bloch, 1999).

En los ratones carentes de desmina (*des -/-*) se ha hallado como característica particular una reducción en la fuerza contráctil, los músculos son menos vulnerables al daño inducido que un músculo normal y la degeneración que sufren las miofibrillas es menos frecuente (Shah, 2004) (Figura 1.12). La desmina, que forma parte de las costameras, es una proteína de los filamentos

intermediarios y su ausencia causa anomalías estructurales como desalineación de las miofibrillas y ruptura de las mismas (Li et. al., 1997; Shah et. al., 2004).

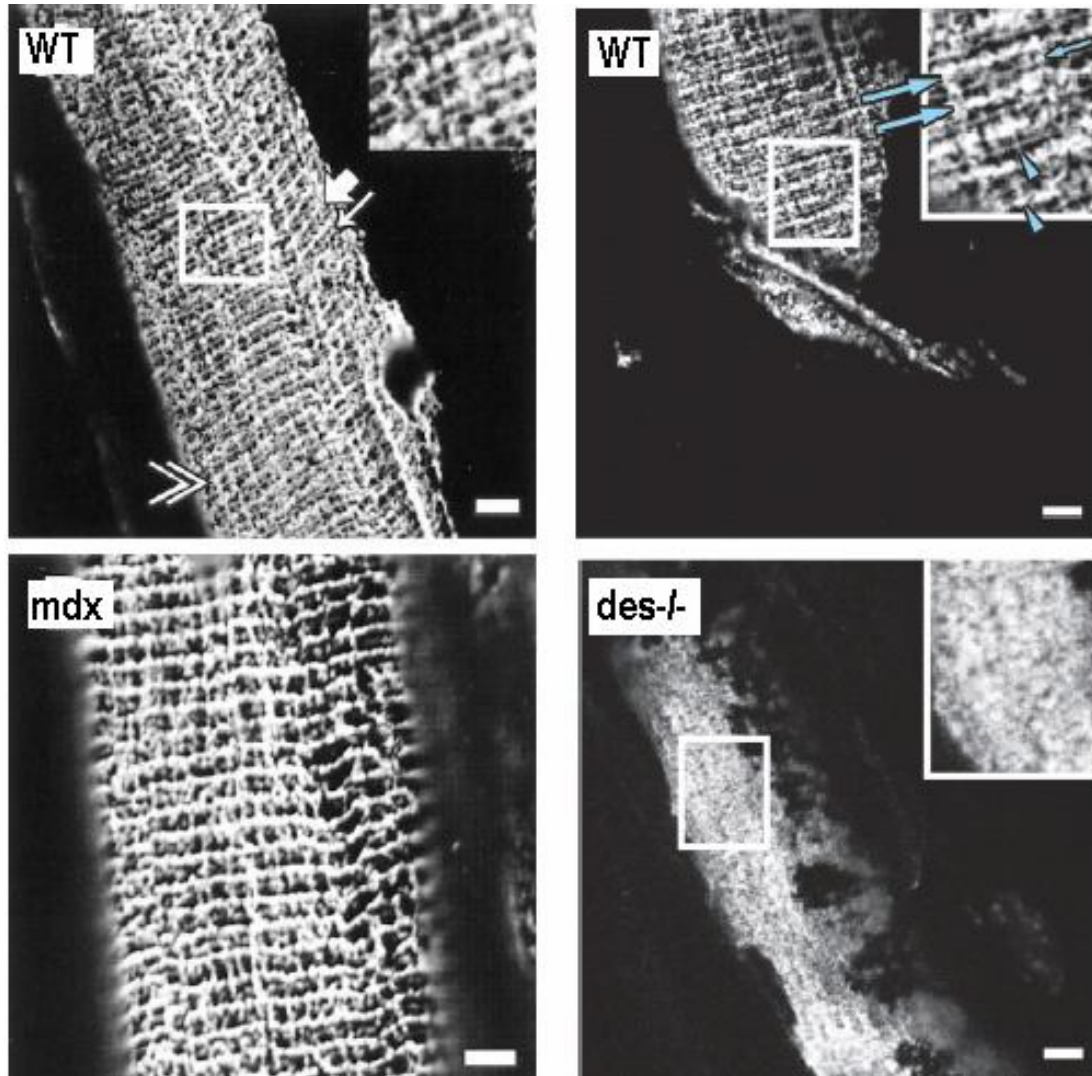


Figura 1.12 Cortes transversales de fibras de ratón *WT*, *mdx* y *des-/-* doblemente inmunomarcadas con β -espectrina y distrofina (*WT*, *mdx*) y β -espectrina y desmina (*WT*, *des-/-*). Las flechas y los insertos muestran las líneas Z y las líneas M en el *WT* que corresponden a las estructuras costaméricas bien definidas a diferencia del *mdx* donde difícilmente se muestran las líneas M o *des-/-* y no hay organización sarcolemal. (Modificado de Williams y Bloch, 1999, y O'Neill et. al., 2002). Las imágenes fueron obtenidas con microscopia confocal.

Capítulo II

Planteamiento del problema

Uno de los caminos por los cuales la fuerza desarrollada por el músculo esquelético puede ser transmitida a través del sarcolema, luego a la matriz extracelular y finalmente a los tendones es la fuerza lateral. En este camino se requiere que el sarcolema establezca una fuerte conexión entre los elementos contráctiles y la matriz extracelular, conexión efectuada a través de las costameras, de lo contrario se tiene la presencia de enfermedades como las distrofias musculares. Dos de las proteínas que conforman a las costameras son la distrofina y la desmina, cuya ausencia o deficiencia causa la distrofia muscular de Duchenne, de Becker o desminopatías.

Conociendo las propiedades biomecánicas del sarcolema y de las costameras tanto en condiciones normales como con alguna miopatía ayudará a entender como es que la ausencia de estas proteínas está vinculada con alteraciones en el sarcolema que propician el decremento en la transmisión de fuerza lateral.

Hipótesis

Considerando que las costameras son un complejo de proteínas localizadas en la región subsarcolemal que unen al citoesqueleto de la célula con el sarcolema y éste con la matriz extracelular y tomando en cuenta que se encargan de recibir y transmitir la fuerza de contracción de manera longitudinal y lateral durante la actividad muscular.

Se piensa que la modificación y ausencia de alguno de los componentes que conforman a las costameras, como en los músculos distróficos, causará una disminución en la función y alteraciones en la estructura de la unidad costamérica. El conocer las propiedades biomecánicas de estos músculos distróficos ayudará al entendimiento de la fisiopatología de las distrofias musculares.

Capítulo III

Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar las propiedades mecánicas del sistema conformado por sarcolema, costameras y aparato contráctil en células musculares esqueléticas de ratón normal, sin distrofina o sin desmina.

3.2 Objetivos particulares

- Mediante el uso del elastómetro se van a determinar algunas propiedades biomecánicas del sarcolema y de las costameras como la tensión, la rigidez, la presión que tolera el sistema así como la presión de rompimiento del sarcolema en células musculares aisladas mecánicamente de Extensor Digitorum Longus de ratón normal para luego ser comparadas con aquellas de ratón sin distrofina o sin desmina.
- Proponer un modelo matemático que describa el comportamiento del complejo costamérico en relación con el sarcolema y la matriz extracelular en condiciones normales y patológicas.

Capítulo IV

Materiales y métodos

4.1 Animales

Se emplearon ratones macho adultos normales o *WT* (*Wild type*) de la cepa C57Bl/10ScSn de entre siete a once semanas de edad y de la cepa C57Bl/10ScSn-DMD-*mdx* que carecen del gen que codifica para la proteína distrofina; ambas cepas son provenientes de la compañía The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA. Un total de 56 músculos Extensor Digitorum Longus control y 26 músculos de murino de tipo *mdx* fueron usados.

También se emplearon 22 músculos EDL de murinos macho de la cepa 129SV *des/-* provenientes del Bioterio de la Universidad de Maryland en Baltimore, MD, USA. La edad fue de entre siete a once semanas de edad.

4.2 Obtención de las células musculares esqueléticas únicas

Antes de la remoción del Extensor Digitorum Longus (EDL), los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical sin el uso de anestesia. Posteriormente se extrajeron los dos músculos EDL (Figura 2.1a) de cada extremidad unidos a sus tendones mediante un par de pinzas de acero inoxidable del número 2 y unas tijeras de disección. Los tendones fueron sujetos de sus extremos con hilo de cáñamo por ser una fibra textil de origen vegetal suave, resistente, absorbente y aislante (Figura 2.1b). Habiendo extraído el EDL, inmediatamente después se colocó en solución Krebs (que contenía en mM: 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 15 NaHCO₃, 11 dextrosa, 1 Na₂HPO₄ y 2.5 CaCl₂ equilibrado con 95% de O₂ y 5% CO₂ pH 7.0) (Figura 2.1c). Después, se puso el EDL en un plato circular donde el hilo de cáñamo se sujetó de unos ganchos, inmovilizando de esta manera al músculo. El plato circular se colocó bajo un microscopio de disección con un aumento en el ocular de x10 y en el objetivo de x45 para proceder con la disección del músculo EDL. El siguiente paso fue aproximar la disección del músculo hasta un grupo de 100 fibras (Figura 2.1d) usando las tijeras rectas Iris para cortar varias células al mismo tiempo, y las tijeras Vannas junto con un escalpelo recto para cortar células individuales. En ese momento, la solución Krebs se sustituyó por una solución libre de calcio (que contenía en mM: 185 K(C₂H₅COO), 2.5 (CH₃COO)₂Mg 4H₂O, 10 Propionato de Imidazol, 2.5 Na₂ATP, 5 EGTA, pH de 7.1). El lavado con la solución libre de calcio se hizo por dos veces

con un tiempo de recambio de 5 minutos entre cada uno. En esta solución, se procedió a la obtención de la célula muscular esquelética única con ayuda de las tijeras Vannas extra delgadas y de un mini-escalpelo. La solución libre de calcio evitó la posibilidad de que se produjeran contracturas ocasionadas por la depolarización de la membrana como resultado de algún estímulo mecánico provocado durante la disección, como por ejemplo el haber retirado el tejido conectivo adyacente entre células musculares. Una vez que se obtuvo la célula muscular única sujeta a sus tendones (Figura 2.1e), ésta se transfirió cuidadosamente a la cámara experimental llena con solución libre de calcio teniendo precaución de no deteriorar a la célula.

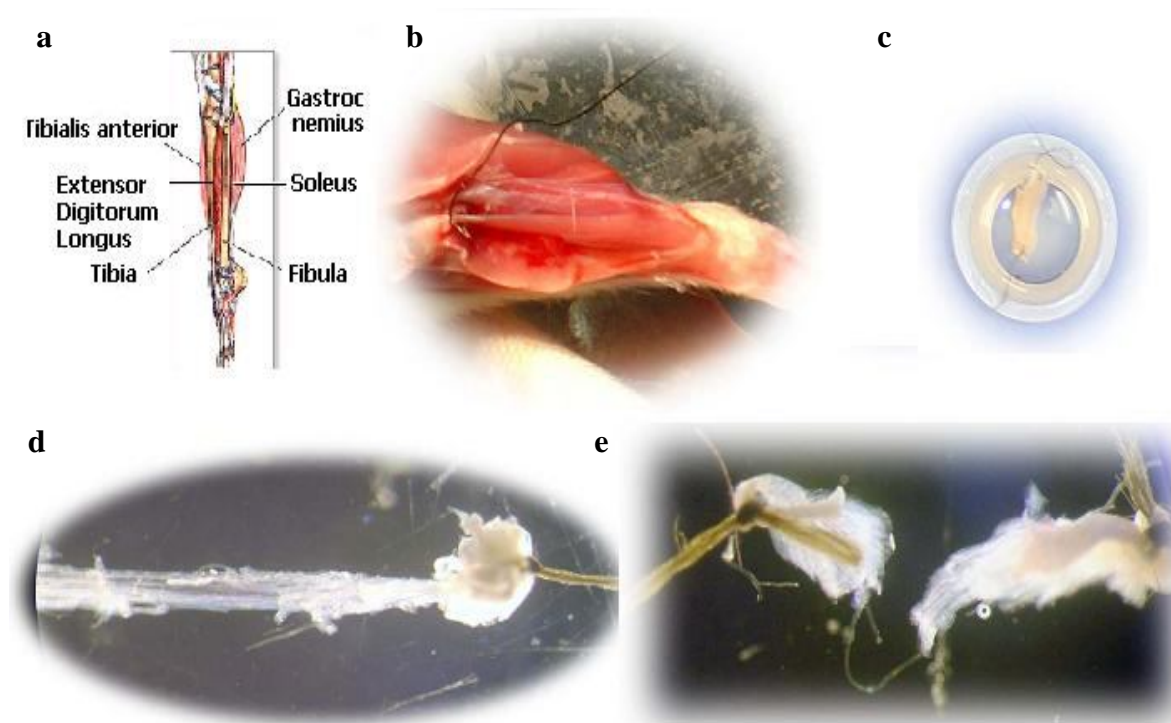
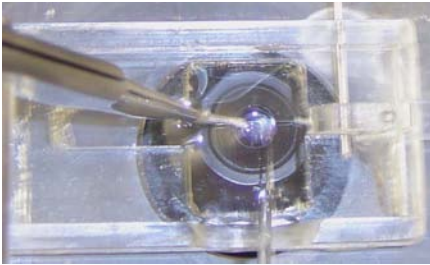


Figura 4.1 a) Localización del EDL en la extremidad derecha de mamífero. b) Extracción del EDL de la pierna del murino donde se observa el hilo de cáñamo sujetando el tendón proximal. c) EDL sujeto a sus tendones dentro del contenedor con solución Krebs. d) Grupo de aproximadamente 100 células musculares. e) Célula muscular única sujeta a sus tendones.

Las disecciones de los músculos EDL provenientes de murino del tipo *mdx* y *des*^{-/-} presentaron un nivel mayor de complejidad si se comparan con las disecciones del tipo *WT* debido al alto contenido de tejido conectivo encontrado alrededor de las células *mdx* y *des*^{-/-}.

Uno de los dos extremos del hilo se sujetó con una palanca a la parte inferior de la cámara (Figura 4.2a), y el otro extremo se fijó mediante unas pinzas finas a un micromanipulador (Leica Microsystems Inc., IL, EE.UU.) mismo que se usó para estirar a la célula muscular a la LS deseada (Figura 4.2b). La LS se midió primero con una retícula graduada posicionada dentro del ocular x10 y luego con el software Image J (NIH, MD, EE.UU.) a través de un micrómetro calibrado colocado dentro de un ocular x25.

a)



b)

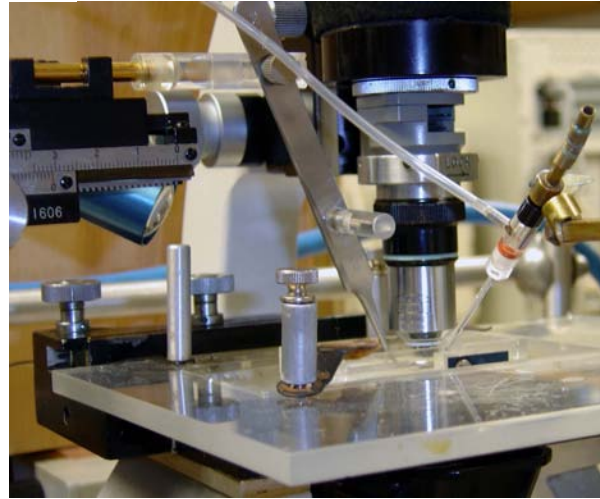


Figura 4.2 a) Célula muscular única colocada en la cámara experimental. b) Fotografía de la cámara experimental situada sobre la platina del microscopio; y las pinzas que están acopladas al micromanipulador.

La cámara experimental se colocó en la platina de un microscopio compuesto (E. Leitz, Inc.) (Figura 4.2b). La temperatura de la solución, libre de calcio, en la cámara experimental fue de 8°C controlada con un sistema Peltier que estaba adaptado a la platina del microscopio. La temperatura fue medida con un termopar tipo K (Cromo(Ni-Cr) Chromel) con un intervalo de temperaturas de (-200, 1,372 °C) conectado a un controlador de temperatura (Yellow Springs Instrument Co., Inc, OH, EE.UU.) y éste último a una fuente de poder (Standard Power Acme Electric Corp., CA., EE.UU.) junto a una bobina de resistencia variable (Ohmite MFG. Co., IL, EE.UU.).

4.2.1 Plato circular

El plato circular estaba hecho de lucita transparente de 8.5 cm de diámetro interno con una altura de 0.7 cm (Figura 4.3a). Consta de 2 ganchos en forma de L de acero inoxidable de 0.7 cm de longitud y calibre 24 colocados uno frente al otro en los extremos del plato circular.

4.2.2 Cámara experimental

La cámara experimental fue hecha de lucita transparente de forma rectangular con dimensiones 7.0x 1.0x 3.0 cm (largo x alto x ancho) con un canal en la parte central para colocar a la fibra (Figura 4.3b). En un extremo de la cámara experimental se encuentra un sistema de palanca hecho también con lucita que sirve para atrapar a uno de los dos hilos que sujetan a los tendones.

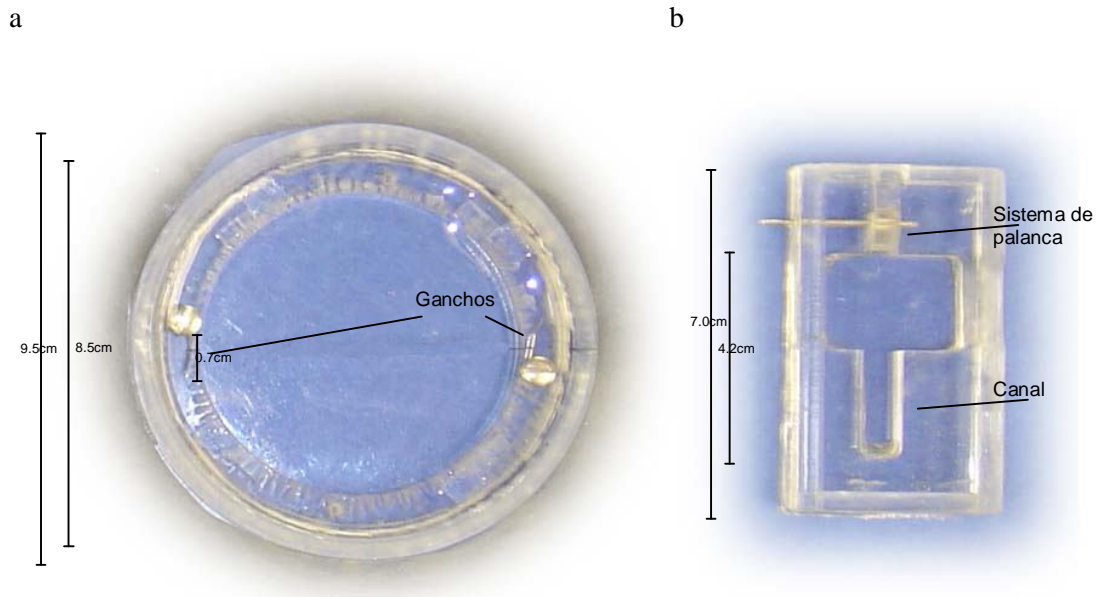


Figura 4.3 a) Plato circular de lucita transparente b) Cámara experimental en donde se sitúa a la célula muscular única.

4.3 Elaboración de las pipetas

Para elaborar las pipetas se utilizó tubo de vidrio tipo SW-T40 porque es resistente a la corrosión alcalina, tolera cambios bruscos de temperatura, es duro, carece de metales pesados y tiene un punto de fusión entre 750-1100°C. La técnica empleada fue similar a la usada por Fonbrune (Fonbrune, 1949) en donde tubos de vidrio con diámetro interno de 2 mm fueron

jalados con un jalador de pipetas (PMP-102 Warner Instruments, Inc EE.UU.) a fin de crear un diámetro interno de 0.50-0.66 veces el diámetro de la célula muscular. Las micropipetas no dañaban al sarcolema ya que éstas tenían una punta plana.

4.4 Obtención de las fotografías

Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital (Nikon D-70 NY, EE.UU.) con una resolución efectiva de 6.1 Mpixeles. La cámara se colocó por encima del microscopio con un dispositivo externo independiente de la instrumentación del microscopio para evitar la transmisión de vibraciones. Se tomaron varias imágenes del domo durante la estabilización de la altura, sin embargo, las únicas medidas que se tomaron en cuenta corresponden a las últimas fotografías una vez que el domo se estabilizó. Como al domo le tomó algún tiempo alcanzar una altura estable, se sugiere un comportamiento viscoelástico (Rapoport, 1972; García-Pelagio et. al., 2008), es decir, un comportamiento semejante al de un sólido elástico a tiempos cortos y de un fluido viscoso a tiempos largos (Boal, 2006).

Las fotografías fueron transferidas a una PC con Adobe Photoshop™ 7.0.1. Las mediciones de la altura, h , del domo se analizaron con Image J (NIH, MD, EE.UU.). Se tomó una microfotografía de un micrómetro para determinar la relación entre el número de píxeles y micras.

4.5 Elastimetría

Modificamos el método empleado por Rapoport (1972). Nosotros usamos una micropipeta conectada a dos manómetros en forma de U. Uno de los manómetro se llenó con mercurio ($\rho=13.5 \text{ g/cm}^3$), y el otro con polietil perfluorinado ($\rho=1.71 \text{ g/cm}^3$) (Miller-Stephenson. CT, EE.UU.), pudiendo aplicar presiones en un intervalo de 1.6×10^3 hasta 801×10^3 dinas/cm². Los manómetros se conectaron en un extremo de la micropipeta y en el otro a un émbolo de la jeringa, a fin de que pudieran ser usados de manera independiente (Figura 2.4). Para evitar que el fluido de los manómetros ejercieran presión sobre la célula muscular de manera involuntaria, éstos se pusieron a una altura tal que la presión de succión fuera cero $\mathbf{P}=0$, de tal forma que no existiese flujo positivo ni negativo a través de la micropipeta. La existencia de un buen sello entre la micropipeta y el sarcolema de la célula se verificó mediante la aplicación de presión de succión, \mathbf{P} , produciendo un domo. Si se obtenía un valor constante de \mathbf{P} , esto indicaba

un buen sello. Por el contrario si el valor de **P** no era constante, la micropipeta era trasladada a otro punto de la superficie de célula o se sustituía la micropipeta. Si ninguna de estas soluciones resultaba eficaz, se descartaba a la célula muscular. Continuamente se comprobaba la estabilidad de **P**, excepto cuando el sarcolema explotaba y por tanto la **P** disminuía. De igual forma, se verificaba la eficacia de los sellos mediante el aumento y la disminución de **P**.

Por lo general, en las células donde el sarcolema mantiene sus uniones con el aparato contráctil, la altura del domo aumentaba a medida que aumentaba la **P**, y disminuía a medida que **P** disminuía, sin existir un cambio en la pendiente de la curva de **P-h** (sin histéresis). Dichas curvas se tomaron como evidencia adicional de buenos sellos.

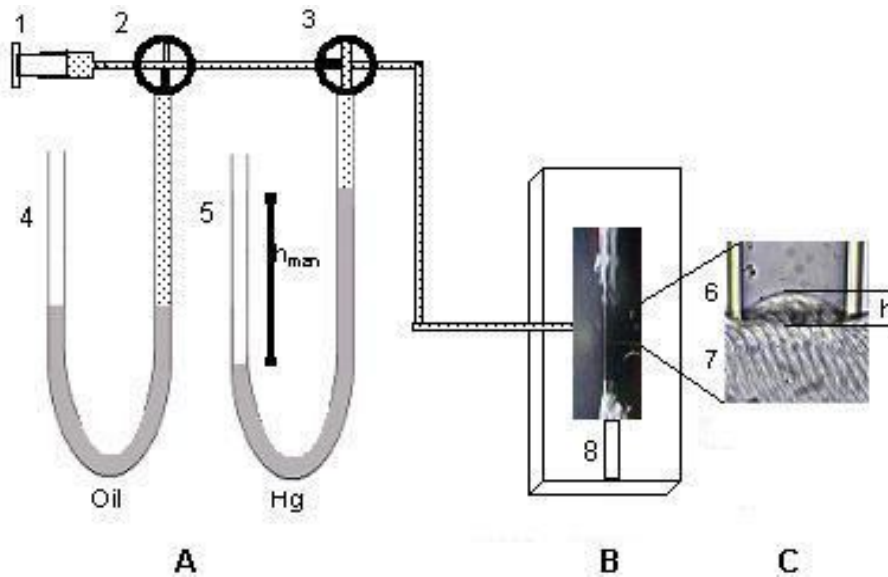


Figura 4.4 Diseño experimental. Consiste de una jeringa unida a dos manómetros en forma de U acoplados en paralelo que a su vez están unidos a la micropipeta en serie. La micropipeta está en contacto con la superficie de la célula muscular por donde se aplica **P** de succión y se forma un domo de altura variable, *h*.

El modelo elástico propuesto por Rapoport (1972) analiza el comportamiento elástico de las líneas de distorsión y tensión formadas por las miofibrillas y el sarcolema en respuesta a las **P** aplicadas sobre un área pequeña conforme el domo se va formando. De manera similar hicimos el análisis para los resultados experimentales. La **P** en dinas / cm² aplicada a la superficie externa de la célula muscular fue calculada a partir de:

$$\mathbf{P} = \rho g h_{\text{man}}$$

1

Donde ρ es la densidad del fluido manométrico en g/cm^3 , $g = 981 \text{ cm/s}^2$ y h_{man} es la diferencia de niveles en el manómetro en relación con $\mathbf{P} = 0$ (Taylor, 2005)(ver Anexo I).

Asumimos que en equilibrio, cuando la altura del domo ya se estabilizó, la presión dentro de la célula es la misma que la del medio de suspensión (solución libre de calcio), independientemente si es antes o después de la separación del sarcolema de las estructuras subyacentes. Para cada valor aplicado de \mathbf{P} , la altura del domo formado en el interior de la pipeta se mide en micras. A las LS usados en este estudio, los diámetros de las células musculares no cambiaron drásticamente conforme \mathbf{P} y aumentan. Como la longitud total de la célula muscular no cambió, entonces el volumen total de la célula se mantuvo constante.

Una vez que h fue medida, \mathbf{P} y r calculados, la tensión promedio de la superficie, γ en dinas/cm, se calculó del siguiente modo (Ver Anexo I):

$$\gamma = \frac{\mathbf{P} \left(\frac{d^2}{8h} + \frac{h}{2} \right)}{2} \quad 2$$

De las curvas \mathbf{P} - h , la tensión de todo el sistema, γ_{s+c+ap} (dinas/cm) antes de la separación del sarcolema, M_s , del aparato contráctil, M_{ap} , se calculó a partir de la ecuación 2. La tensión del sarcolema aislado tras la separación de éste del aparato contráctil, γ_s (dinas/cm), se estimó con la misma ecuación 3, a partir de los datos experimentales en el segmento de la curva de \mathbf{P} - h después de la separación de la membrana de la superficie del mioplasma. En esta condición, las miofibrillas no contribuyen a la tensión de la membrana de la superficie.

Se presume que las uniones entre las miofibrillas periféricas y el sarcolema se deban a las costameras. La separación del sarcolema de las miofibrillas más superficiales se produce cuando la presión aplicada a la superficie de la membrana es alta. Como la separación de las miofibrillas del sarcolema ocurre sin que se rompa ninguna de éstas estructuras, se propone que la ruptura se produce en las estructuras que unen a las miofibrillas con el sarcolema, es decir, en las costameras junto con sus estructuras citoplasmáticas asociadas. Por lo tanto, la tensión ejercida

por las costameras junto con sus estructuras citoplasmáticas asociadas (γ_c) se obtiene mediante la resta de γ_s de γ_{s+c+ap} :

$$\gamma_{s+c+ap} = \gamma_s + \gamma_c + \gamma_{ap} \quad (\text{dinas / cm}) \quad 3$$

Por lo tanto,

$$\gamma_c = \gamma_{s+c+ap} - \gamma_s - \gamma_{ap} \quad (\text{dinas / cm}) \quad 4$$

Pero $\gamma_{ap} = 0$ cuando el sarcolema se ha separado del aparato contráctil, por lo que no contribuye a γ_c , entonces,

$$\gamma_c = \gamma_{s+c+ap} - \gamma_s \quad (\text{dinas / cm}) \quad 5$$

Las miofibrillas, las costameras junto con sus estructuras citoplasmáticas asociadas y sarcolema se consideraron como tres elementos elásticos diferentes, cada uno con sus propiedades elásticas particulares. El sarcolema y las miofibrillas actúan como resortes en paralelo, unidos en ángulo recto por los elementos costaméricos que actúan como un solo resorte. A una longitud de equilibrio muscular ($2\mu\text{m}/\text{LS}$), los resortes no están estirados, pero cuando la fibra se extiende a más de $2\mu\text{m}/\text{LS}$, la tensión de cada resorte aumenta en función de la LS.

Como la tensión superficial es inversamente proporcional a la temperatura (Demeneghi et. al., 2003; Srivastava y Jain, 2006), nuestros experimentos fueron hechos a una temperatura constante de 8.0 ± 0.5 °C. La célula muscular pudo ser usada por un tiempo máximo de 4 hr antes de mostrar signos de deterioro como por ejemplo: la formación de domos recurrentes en la membrana de manera espontánea, muestras de abultamiento espontáneo, cambios en la LS, o la falta de reproducibilidad en los datos registrados en regiones cercanas de la misma fibra.

La fuerza, F (dinas) aplicada a la membrana a una **P** dada se calcula a partir de (Ver Anexo 1):

$$F = \mathbf{P} A \quad (\text{dinas}/\text{cm}^2) \quad 6$$

Dado que el radio, r, de la pipeta es siempre el mismo, se puede estimar el área, A, considerando al domo como un casquete esférico. Por lo tanto, A (cm^2) se calculó a partir de $A = 2\pi r h$.

La rigidez o constante del resorte (k) se relaciona con la capacidad de las células para resistir la deformación cuando se somete a alguna carga (Leckie y Dal Bello, 2009). Esto también representa la elasticidad del material en estudio, es decir, un material es más elástico, cuanto menos es deformado por una fuerza dada; y será menos elástico mientras mas dócil es. k fue estimada a partir de (Ver Anexo I):

$$k = \frac{F}{h} \quad (\text{dinas/cm}) \quad 7$$

4.6 Elastimetría en las células musculares esqueléticas

Las propiedades elásticas del sarcolema y la fuerza de sus conexiones con el aparato contráctil subyacente fueron calculadas usando la elastimetría. La P , fue aplicada sobre un área pequeña del sarcolema (aproximadamente $250-300 \mu\text{m}^2$) a través de una pipeta de succión. Las células musculares con una $LS \leq 2\mu\text{m}$, al aplicarles la P no mostraban un cambio significativo en la tensión superficial. Cuando la $LS > 2\mu\text{m}$ el sarcolema se tensaba y la tensión superficial (γ) aumentaba. A $LS < 3\mu\text{m}$ existen invaginaciones del sarcolema y caveolas (Dulhunty y Franzini-Armstrong, 1975). Al aplicar la P de succión a LS cortas, de igual manera se formaba el domo y las caveolas eran desdobladas a medida que la P incrementaba, pero el cálculo de la γ presentaba complicaciones. Por lo que se decidió trabajar principalmente a $LS > 3.5 \mu\text{m}$ obteniendo curvas de P - h confiables y donde la contribución de las caveolas es mínima (Dulhunty y Franzini-Armstrong, 1975).

Cuando se aplicaba P de succión a través de micropipetas con diámetro pequeño (0.34 - 0.50 veces mas pequeñas que el diámetro de la fibra para evitar que la micropipeta succione toda la fibra o bien que se necesite demasiada presión para obtener el domo) para estudiar a las células musculares con $LS > 3.0 \mu\text{m}$, la superficie de la célula inducía la formación de domos de altura variable, h . La h era función de P y LS (Figura 4.5). A P bajas, el sarcolema y el aparato contráctil subyacentes se introdujeron a la pipeta (Figura 4.5a); el movimiento del aparato contráctil dentro de la pipeta fue mínimo en comparación con el diámetro de la fibra, lo que minimiza los cambios de volumen. Si P disminuía, h también lo hacía y el domo regresaba a su altura inicial. A medida que P aumentaba, h lo hacía también, hasta que a valores altos de P el sarcolema se separaba del aparato contráctil (Figura 4.5b), y permanecía separado incluso cuando la P llegaba a 0 por lo que era un fenómeno irreversible. A mayores aumentos en P , se tenían

mayores aumentos en h ; teniendo sólo efectos mínimos en las miofibrillas adyacentes (Rapaport 1972).

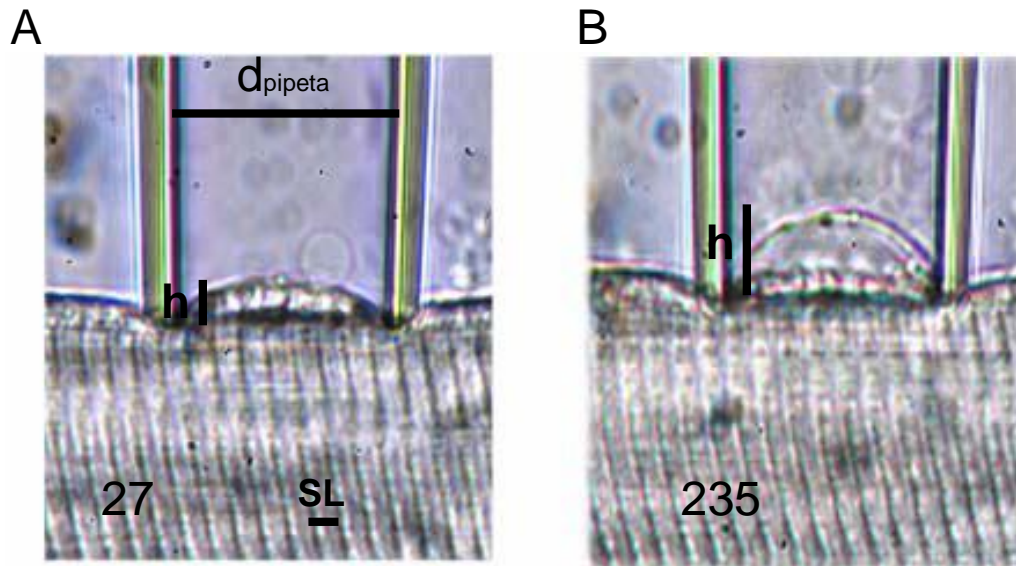


Figura 4.5 Generación del domo al aplicar P de succión sobre la superficie de la célula muscular, tal que, a) el sarcolema y miofibrillas subyacentes penetraron a la pipeta y b) al momento de que el sarcolema se separaba de las miofibrillas subyacentes. $P \times 10^3$ dinas/cm² se muestra en la parte inferior izquierda de cada fotografía. $LS = 3.4\mu\text{m}$

4.7 Obtención de los valores de rigidez en el modelo elástico distribuido

El modelo elástico distribuido fue resuelto mediante métodos numéricos desarrollados en Excel de Microsoft Corporation (EE.UU.) y Simulink de Matlab (Mathworks, MA, EE.UU.).

4.8 Estadística

La tensión, la presión y la rigidez se analizaron mediante un análisis de 2 vías de la varianza (ANOVA) con un análisis post hoc (Kruskal-Wallis). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los resultados se reportan como media \pm desviación estándar (DE). También se muestra la varianza de la población (V) para las medidas de tensión y presión que indica el grado de dispersión de los datos experimentales.

Parte del trabajo experimental se realizó en el laboratorio del Dr. Hugo González-Serratos[†] y del Dr. Robert J. Bloch adscritos al Departamento de Fisiología de la Escuela de Medicina en la Universidad de Maryland a quienes les agradecemos su generosa y muy valiosa colaboración.

CAPITULO V

Resultados

5.1 Propiedades mecánicas del sistema sarcolema, costameras y miofibrillas en el ratón normal (*WT*)

5.1.1 Desplazamiento vertical del domo, h , como función de la presión de succión, P

Se obtuvieron series de microfotografías de la formación del domo en el sarcolema conforme la presión de succión aumentaba progresivamente en células musculares esqueléticas únicas de EDL de ratón *WT* (Figura 5.1) encontrando una dependencia de la altura del domo con la P .

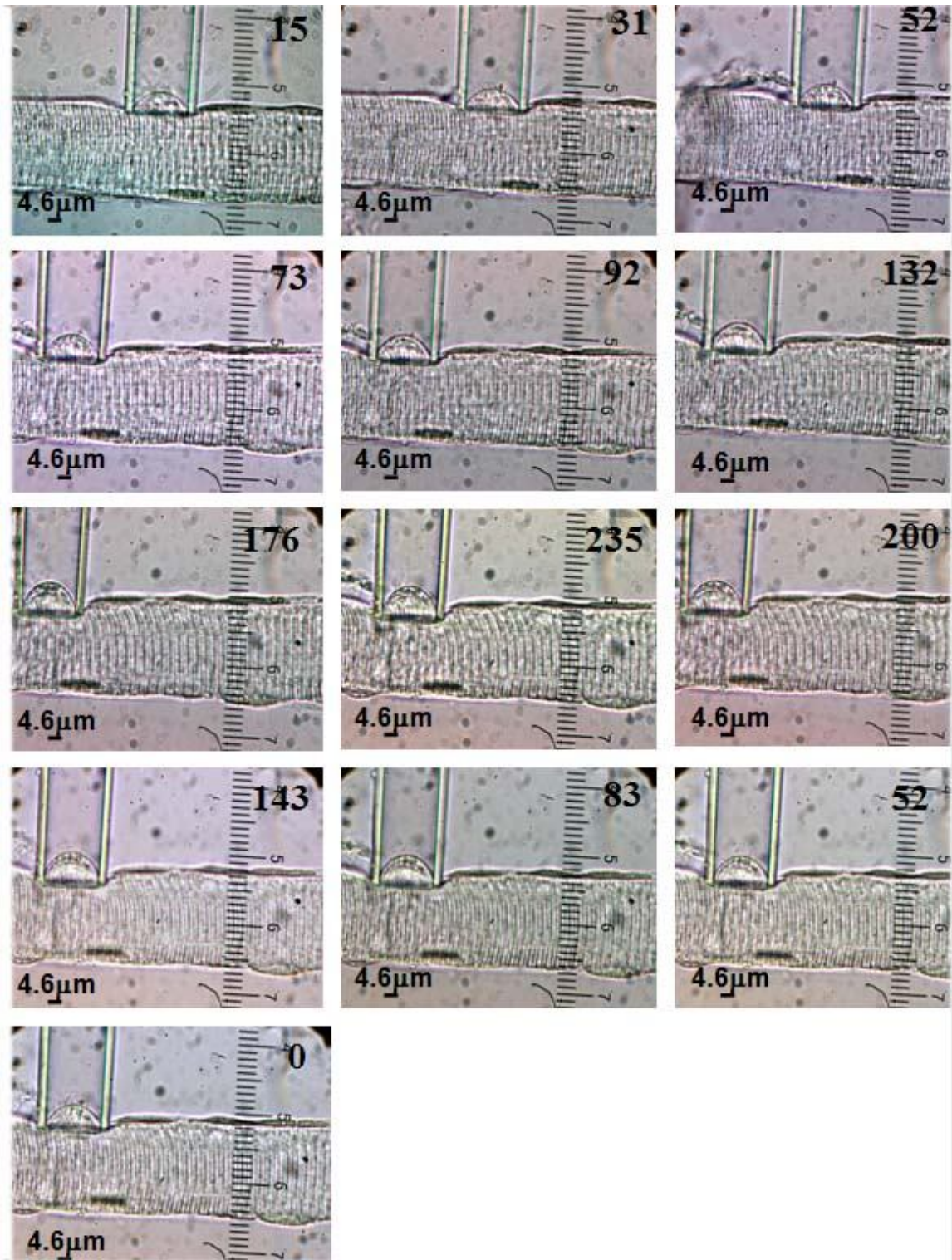


Figura 5.1 Formación del domo a medida que se incrementó **P** en una célula muscular de ratón normal. El valor de **P** en mm Hg se muestra en la parte superior derecha de cada fotografía, LS=3.1μm.

En la Figura 5.1 se muestra una serie de 13 fotografías para un solo experimento en donde se incrementó la **P** de succión progresivamente (Figura 5.1 a-h) llegando a la separación del sarcolema de los elementos contráctiles (Figura 5.1 e); posteriormente la **P** de succión disminuyó paulatinamente hasta llegar a 0 (Figura 5.1 i-m). Los parámetros que se midieron en estas fotografías fueron: la altura *h* del domo, la *LS*, el diámetro de la pipeta y el diámetro de la fibra. Una vez medidos estos parámetros en cada serie de fotografías, se generaron las curvas de desplazamiento vertical como función de la presión aplicada (**P-h**) para todas las células musculares examinadas, a fin de determinar el comportamiento del sarcolema y las miofibrillas subyacentes en el domo en función de **P**. No se observaron cambios significativos en la *LS* ni en las miofibrillas cercanas que contribuyeran a la formación del domo conforme **P** aumentaba, lo que sugirió que el sarcolema y las miofibrillas subyacentes mantuvieron su relación estructural. Todas las mediciones realizadas fueron hechas en equilibrio, es decir cuando la altura del domo ya no tenía cambio alguno.

Las curva experimental de (**P-h**) para el músculo *WT* mostró tres segmentos distintos (Figura 5.2). En el primero, obtenido a presiones de succión bajas (Figura 5.2, puntos 2-16), el sarcolema se mantuvo unido a las miofibrillas subyacentes del domo. La relación **P-h** en este segmento fue reversible (Figura 5.2, puntos 8-10 y 14-16), es decir no existe la presencia de histéresis cuando **P** se redujo. Observaciones morfológicas indicaron que el sistema formado por el sarcolema, costameras y aparato contráctil se mantuvo intacto.

La siguiente parte de la curva de **P-h** (Figura 5.2, puntos 17-19), medida a presiones de succión mayores, mostró una disminución en la pendiente, es decir un cambio negativo. Esta disminución en la pendiente fue ocasionada por la separación física del sarcolema de las miofibrillas (Figura 5.2, letra **S**). En esta región el sarcolema se distendió mas para el mismo incremento en presión, probablemente porque no estaba restringido por las uniones a las estructuras contráctiles.

El tercer segmento de la curva (Figura 5.2 puntos 19-23), se obtuvo mediante la reducción de **P** después de la separación del sarcolema de las miofibrillas subyacentes, lo que dio lugar a diferentes valores de *h* para el mismo valor de **P** antes de la separación. Se observa la presencia de histéresis en la curva **P-h**, lo que indica que las propiedades mecánicas del sistema son diferentes antes y después de la separación.

De la curva **P-h** pudimos obtener la contribución del sistema total conformado por el sarcolema, las costámeras y los elementos contráctiles (primera parte) y, una vez separado el sarcolema de los elementos contráctiles subyacentes al domo (tercera parte) se obtuvo la contribución del sarcolema. La diferencia de la contribución del sistema total y la del sarcolema dio la contribución de las costameras.

La **P** de succión es dependiente con la altura **h** del domo hasta el punto en el que el sarcolema se separa del aparato contráctil subyacente al domo (denotado por **S**); pasando **S** la pendiente de la curva decrece hasta llegar a la región de histéresis donde la pendiente de la curva decrece aun más. Por lo que la curva **P-h** brinda información del sistema total y del sarcolema solo.

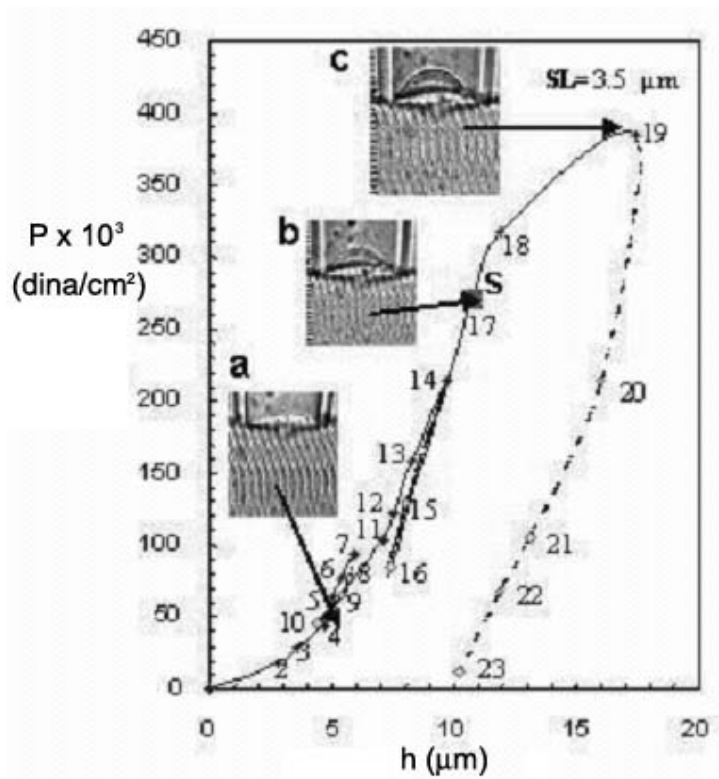


Figura 5.2 Curva **P-h** para una célula muscular única de ratón **WT**. La **P** se incrementó paulatinamente (líneas continuas) y después se disminuyó (líneas segmentadas). **S** denota la **P** de separación del sarcolema de los elementos contráctiles subyacentes al domo (punto 17). Se muestran dos fotografías de los cambios morfológicos de la célula muscular cuando a) el sistema total está unido, b) cuando ocurre la separación del sarcolema de los elementos contráctiles, subyacentes al domo. La curva muestra una región de histéresis.

5.1.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto

El dispositivo experimental empleado, permitió estirar longitudinalmente a la célula muscular hasta una LS deseada y aplicar la presión de succión hasta tener datos suficientes para construir la curva **P-h**.

Habiendo generado las distintas curvas **P-h** para distintas LS, las pendientes de las curvas **P-h**, en la región ascendente (Figura 5.3, líneas continuas) mostraron una fuerte dependencia con la longitud del sarcómero para **P** antes de S. En particular, se necesitaron valores de **P** elevados para producir el mismo aumento en h conforme iba aumentando la LS. Lo anterior sugiere que el aparato contráctil contribuye significativamente a la rigidez del sarcolema en el sistema total. Este comportamiento no fue el mismo para el caso donde el sarcolema se había separado del aparato contráctil subyacente al domo, (brazo descendente de la curva **P-h**) registrando escasa variación con respecto la LS, lo que indicó que el aparato contráctil ya no tenía ninguna influencia sobre la elasticidad del sarcolema aislado.

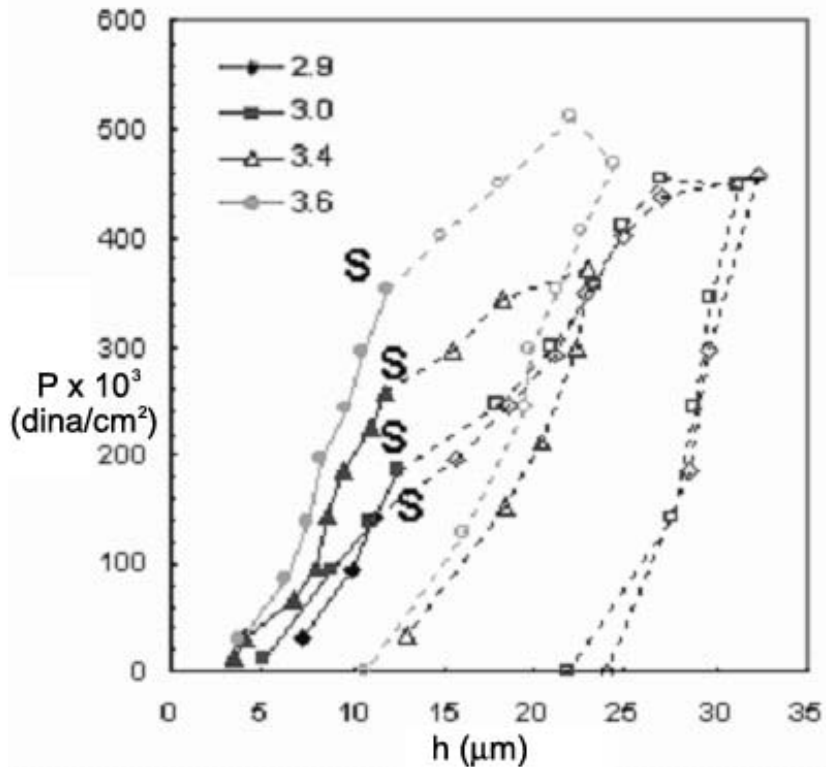


Figura 5.3 Efecto de la LS en la **P** de separación del sarcolema del aparato contráctil subyacente al domo. Se muestran 4 curvas **P**-h a 4 LS en células musculares únicas de ratón *WT*. Segmento ascendente de la curva antes de la separación (líneas continuas y símbolos llenos) y después de la separación (líneas segmentadas y símbolos vacíos).

De la Figura 5.3 observamos que se requirió mayor **P** de succión necesaria para separar al sarcolema del aparato contráctil subyacente, a LS largos; y por el contrario se necesitó de menor **P** de succión a LS cortos para separar al sarcolema del aparato contráctil. Es decir, a $3.6\mu\text{m}$ la presión de separación, $P_{\text{sep}} = 358 \times 10^3$ dinas/cm 2 mientras que a $2.9\mu\text{m}$ la $P_{\text{sep}} = 194 \times 10^3$ dinas/cm 2 . Esto sugiere que los elementos contráctiles contribuyen significativamente a la rigidez del sarcolema. Misma relación se presentó con el desplazamiento vertical del domo, donde a LS grandes se necesitó mayor **P** para obtener el mismo desplazamiento vertical que a LS cortos, i.e. para obtener un desplazamiento vertical $h = 10\mu\text{m}$ a una LS = $3.6\mu\text{m}$ la $P = 218 \times 10^3$ dina/cm 2 y a una LS = $2.9\mu\text{m}$ la $P = 97 \times 10^3$ dina/cm 2 .

La P_{sep} fue también una función de la LS, ya que se necesitó de mayor presión para causar la separación del sarcolema del aparato contráctil subyacente conforme LS iba

incrementando (Figura 5.4). El cambio en P_{sep} fue mayor de LS de 3.6 μm a 4.3 μm . Los cambios en LS de entre 2.9 y 3.0 μm no fueron estadísticamente significativos.

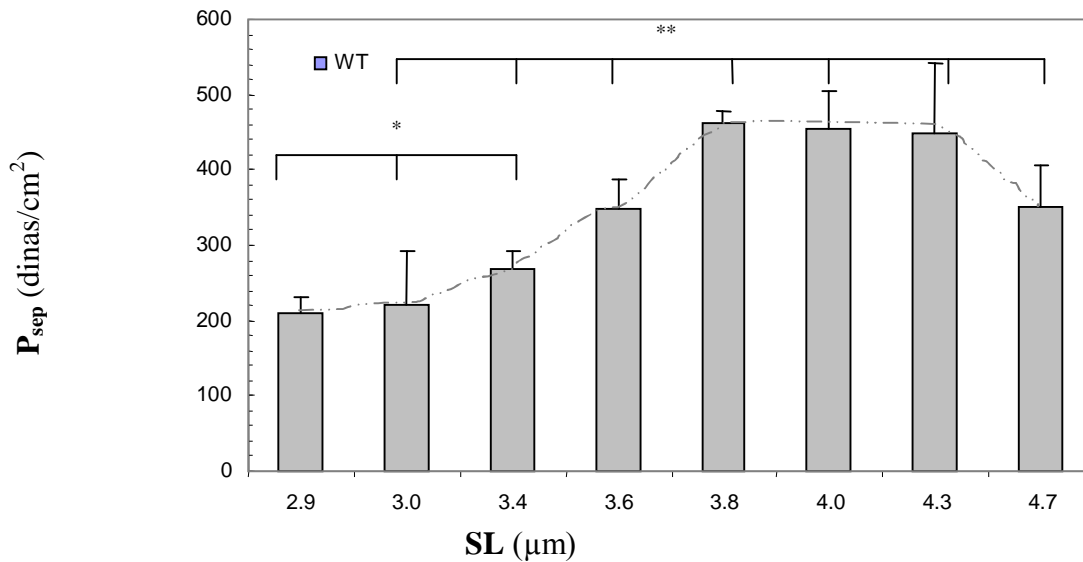


Figura 5.4 Histogramas del efecto de la LS en relación a la P_{sep} . Las barras indican la media \pm DS, ** indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.01$ y * $p < 0.1$; $n=4$ para $LS=2.9$ y $4.7\mu\text{m}$ y $n=8$ para los valores restantes. Se trazó una línea punteada que une a los valores promedio de cada barra como ayuda visual.

La P de succión necesaria para que el sarcolema se separe de los elementos contráctiles está limitada entre otros factores por los componentes elásticos del sarcómero. La P_{sep} a LS entre 2.9 y 3.4 μm permanece a un valor promedio de $231 \pm 43 \times 10^3$ dina/cm², sin embargo de 3.6 y 3.8 μm incrementa de 348 ± 39 a $455 \pm 18 \times 10^3$ dina/cm² respectivamente, y para valores de LS entre 4.0 y 4.3 μm la P_{sep} oscila alrededor de $451 \pm 49 \times 10^3$ dina/cm².

Nuevos aumentos en P , después de que el sarcolema se separara de las miofibrillas subyacentes, causaron que el domo estallara (Figura 5.5). La presión a la que se produjo el rompimiento del sarcolema, P_{romp} , fue independiente de la LS (Fig. 5.6 y Tabla 5.1).



Figura 5.5 Rompimiento del domo sarcolemal a P elevadas. Se incrementó la P de succión aplicada en la membrana de la célula muscular pasando por la P_{sep} e incrementando mas la presión hasta que el sarcolema se rompió en P_{romp} . $LS = 3.2 \mu m$, P en mm Hg está indicado en la parte inferior izquierda.

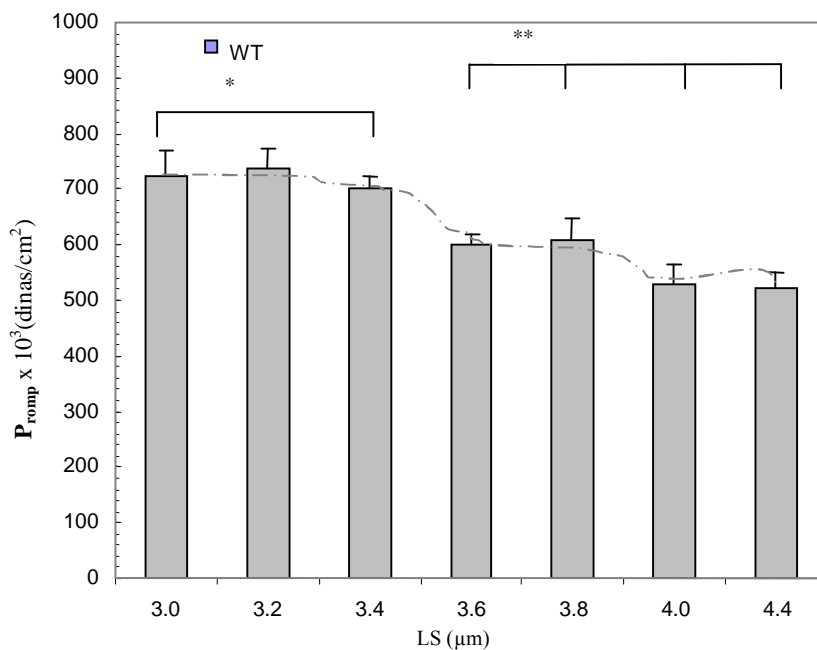


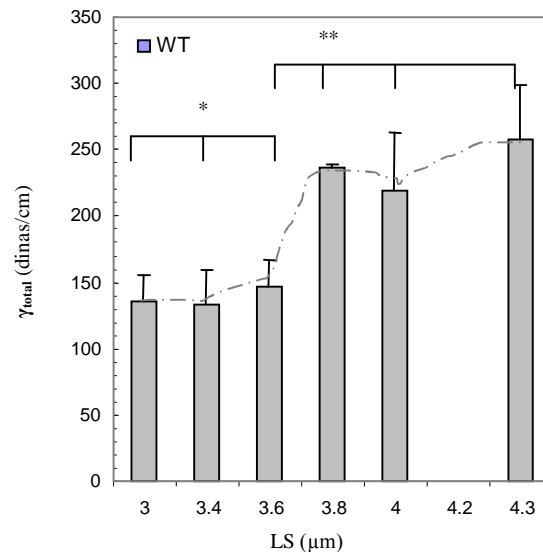
Figura 5.6 Histogramas de la presión de rompimiento del sarcolema en células musculares *WT* como función de la *LS*. Las barras indican la media \pm DS, ** indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.01$ y * $p < 0.05$; $n=3$ para $LS=3.0-3.4$ y $4.0 \mu m$, y $n=5$ para los valores restantes. Se trazó una línea punteada que une a los valores promedio de cada barra como ayuda visual

5.1.3 Comportamiento elástico del sistema sarcolema-costameras-miofibrillas de la célula muscular esquelética

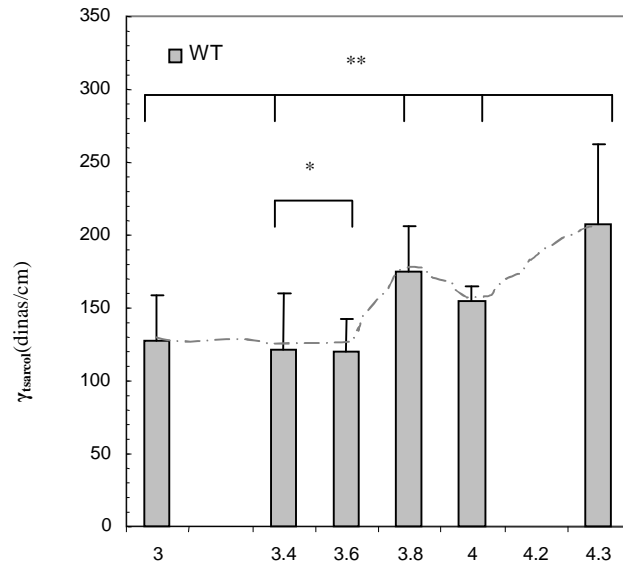
El sarcolema y el aparato contráctil subyacente se modelaron como un cuerpo elástico compuesto de tres elementos principales: el sarcolema, las costameras y el mioplasma, cada uno con sus propiedades elásticas que en conjunto generan al sistema completo. Primeramente caracterizamos las propiedades elásticas como la tensión (γ) y la rigidez (k) del sistema total, luego del sarcolema y por último de las costameras. La contribución del mioplasma no se toma en cuenta.

Usando la ecuación de Young-Laplace (Anexo 1) y los datos de las curvas P-h antes de la separación del sarcolema de los elementos contráctiles, se calculó la tensión total del sistema, γ_{total} conformado por el sarcolema, costameras y aparato contráctil (Figura 5.7a); la tensión del sarcolema, γ_{sarcol} (Figura 5.7b) una vez separado éste de los elementos contráctiles subyacentes. En esta condición las miofibrillas no contribuyen mas a la tensión de la membrana ya que están desunidas del sarcolema, y nosotros atribuimos que las uniones entre las miofibrillas periféricas y el sarcolema se deben a las costameras. La tensión máxima sostenida por las costameras y sus vínculos con las miofibrillas, γ_{cost} , (Fig. 5.7c) se obtuvo restando γ_{sarcol} de γ_{total} (Tabla 5.1).

a



b



c

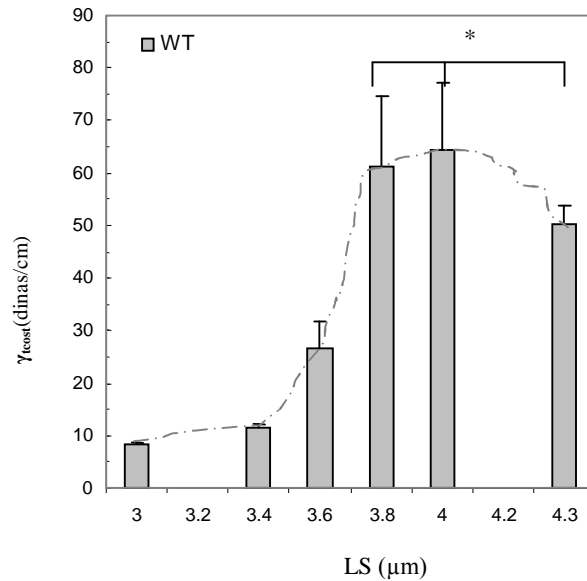


Figura 5.7 Tensión superficial (γ) como función de la LS. La figura muestra tres histogramas que corresponden a la γ_{total} (a), γ_{sarcol} (b) y γ_{cost} (c) a diferentes longitudes de sarcómero. Las barras indican la media \pm DS; ** indica valores significativamente diferentes entre sí con $p < 0.01$ y * $p < 0.05$; $n=7$. Se trazó una línea punteada que une a los valores promedio de cada barra simplemente como ayuda visual.

La dependencia de γ_{total} y de γ_{sarcol} con respecto a LS se hace mas marcada a $LS \geq 3.8\mu m$ no así con γ_{cost} donde existe diferencia a partir de $LS \geq 3.6\mu m$. También se examinó la varianza, V , de nuestros datos para evaluar la variabilidad de las mediciones (Tabla 5.1).

Se calculó la rigidez del sistema total conformado por el sarcolema, los elementos contráctiles, y las costameras junto con sus estructuras citoplasmáticas (k_{total}) y la del sarcolema (k_{sarcol}) tomando como primera aproximación la Ley de Hooke (Anexo 1) y la pendiente de la curva **P-h** (Anexo 1). Para la célula única de tipo **WT**, los tres segmentos de la curva mostraron 3 pendientes diferentes, la del sistema total (k_{total}); la del sarcolema inmediatamente después de la separación y la del sarcolema (k_{sarcol}). Los valores de **k** guardan una estrecha relación con la longitud de sarcómero (Figura 5.8).

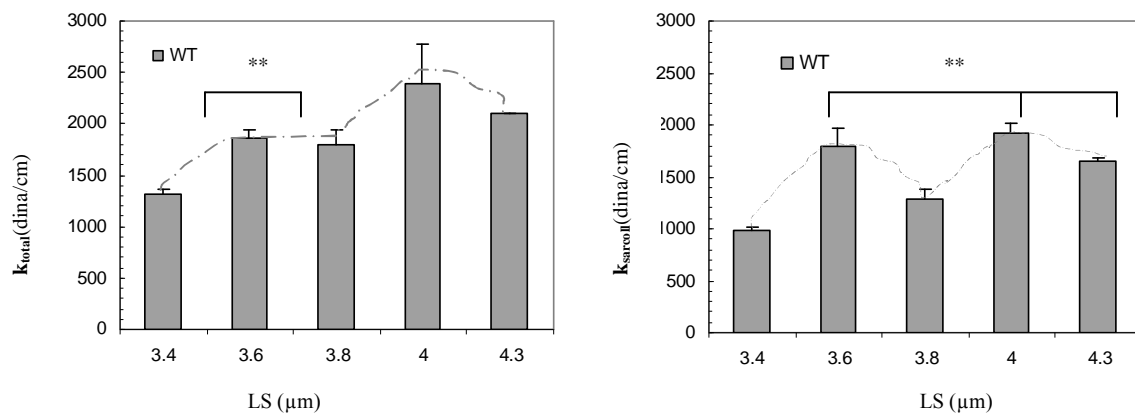


Figura 5.8 Rigidez (**k**) del A) sistema total y B) del sarcolema. Las barras indican la media \pm DS; ** indica $p < 0.01$ para todos los experimentos, $n = 7$. Se trazó una línea punteada que une a los valores promedio de cada barra como ayuda visual.

En la Figura 5.8, para todos los casos $k_{total} > k_{sarcol}$ lo que indica que el sistema completo es mas rígido que el sarcolema por si solo y que el sarcolema cede mas que el sistema total. Como el sarcolema y las miofibrillas permanecen intactos después de la separación, las uniones entre ellas, establecidas en parte por las costameras, son las estructuras más débiles del sistema. k_{total} pudo ser aproximado a un valor promedio 1894 ± 142 dina/cm lo mismo que k_{sarcol} a un valor promedio de 1524 ± 96 dina/cm. La k_{tot} tiene valores más grandes que la k_{sarcol} por $\sim 20\%$, i.e.

$k_{total} > k_{sarcol}$ lo que indica que se necesita mas fuerza para alcanzar la misma deformación en el sistema total que en el sarcolema, siendo el sistema total es mas rígido que el sarcolema.

Tabla 5.1 Valores de P_{sep} , P_{romp} , k_{total} , k_{sarcol} , γ_{total} , γ_{sarcol} , γ_{cost} y las varianzas expresados como la media \pm DS calculados para todas las LS examinadas en células musculares únicas de tipo *WT*.

$P_{sep} \times 10^3$ dinas/cm ²	$P_{romp} \times 10^3$ dinas/cm ²	k_{total} dinas/cm	k_{sarcol} dinas/cm	γ_{total} dinas/cm ²	$V_{\gamma_{total}}$	γ_{sarcol} dinas/cm ²	$V_{\gamma_{sarcol}}$	γ_{cost} dinas/cm ²	$V_{\gamma_{cost}}$
367 \pm 26	631 \pm 47	1894 \pm 142	1524 \pm 96	188 \pm 21	46 \pm 5	151 \pm 25	30 \pm 4	37 \pm 6	4 \pm 1

5.2 Propiedades mecánicas del sistema sarcolema, costameras y miofibrillas en el ratón sin distrofina (*mdx*)

5.2.1 Desplazamiento vertical del domo, h , como función de la presión de succión, P

Se obtuvieron varias series de microfotografías de la formación del domo en el sarcolema conforme la presión de succión aumentaba progresivamente en células esqueléticas únicas del músculo EDL del ratón *mdx*, encontrando una dependencia de la altura del domo con la P . A continuación se muestra una serie de fotografías para un experimento (Figura 3.9) donde la P aumenta (Figura 3.9 b-e) llegando a la separación del sarcolema del aparato contráctil subyacente (Figura 3.9 f) y posteriormente la P disminuye (Figura 3.9 h-k) quedando separado el sarcolema.

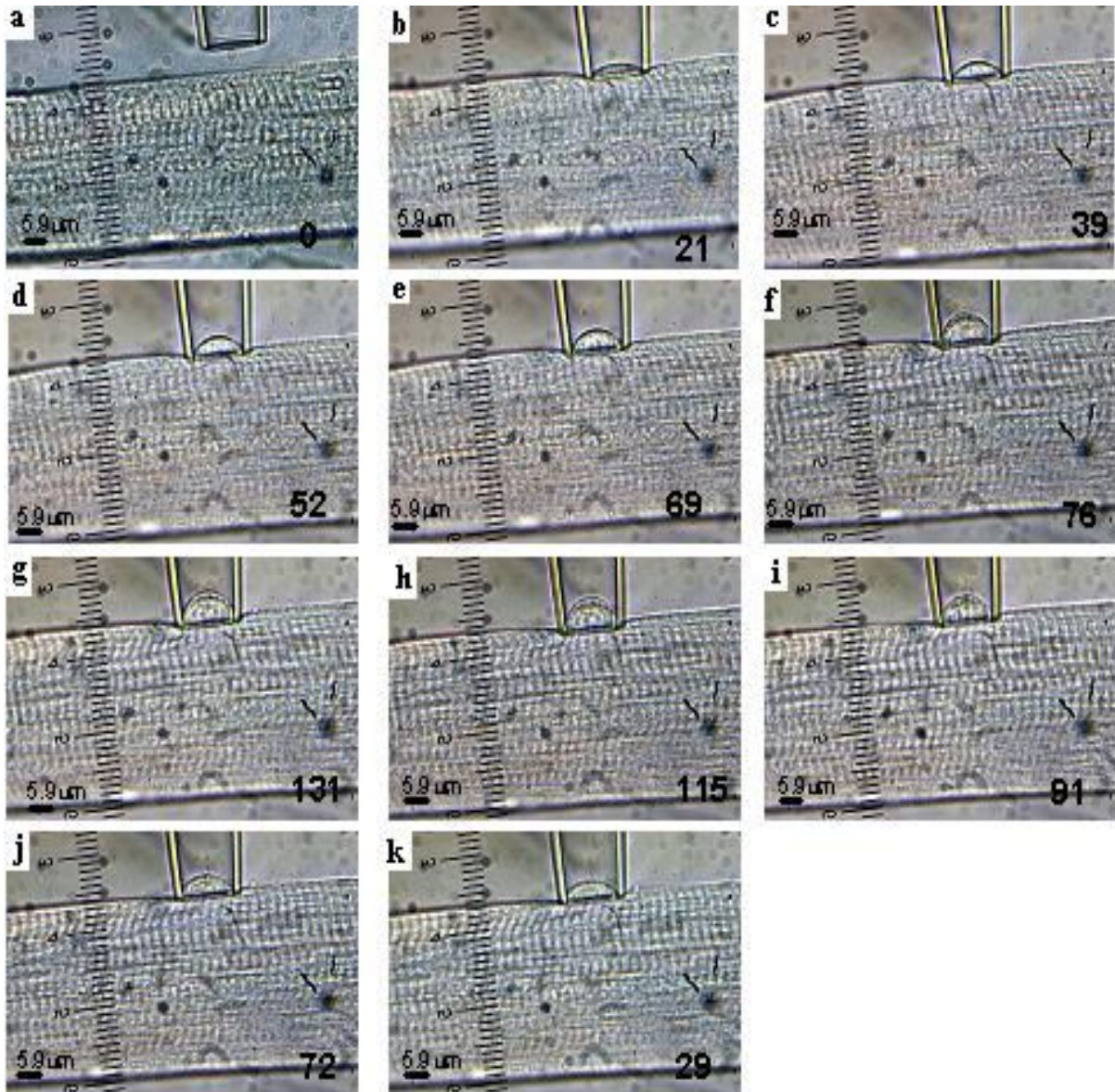


Figura 5.9 Formación del domo sarcolemal en una célula muscular de ratón *mdx*, a medida que se incrementó (b-g) y decrementó (h-k) la **P** de succión. El valor de **P** en mm Hg se muestra en la parte inferior derecha de cada fotografía, LS = 3.4 μ m.

No se observaron cambios significativos en la LS dentro de la pipeta ni en las miofibrillas cercanas que contribuyeran a la formación del domo conforme **P** aumentó, lo que fue interpretado como que estos elementos mantuvieron su relación estructural.

Las curva experimental de (**P**-h) (Figura 5.10) para las células musculares de tipo *mdx* mostró tres segmentos distintos. En el primer segmento, que fue obtenido a **P** bajas (Figura 5.10, puntos 1-3), el sarcolema se mantuvo unido a las miofibrillas subyacentes del domo. En el siguiente segmento (Figura 5.10, puntos 4-8), las presiones de succión fueron mayores, y la curva mostró una pendiente menor respecto al primer segmento. Esta disminución en la pendiente fue ocasionada por la separación física del sarcolema de las miofibrillas (Figura 5.10, letra **S** punto 4) y el sarcolema se distendió mas para el mismo incremento en presión, probablemente porque ya no estaba restringido por las uniones a las estructuras contráctiles. En el último segmento (Figura 5.10 puntos 9-15), los puntos experimentales se obtuvieron mediante la reducción de **P** después de la separación del sarcolema de las miofibrillas subyacentes, y como consecuencia se obtuvieron diferentes valores de h para el mismo valor de **P** antes de la separación. En ésta última región de la curva, se observó la presencia de histéresis indicando que las propiedades mecánicas del sistema antes y después de la separación son diferentes.

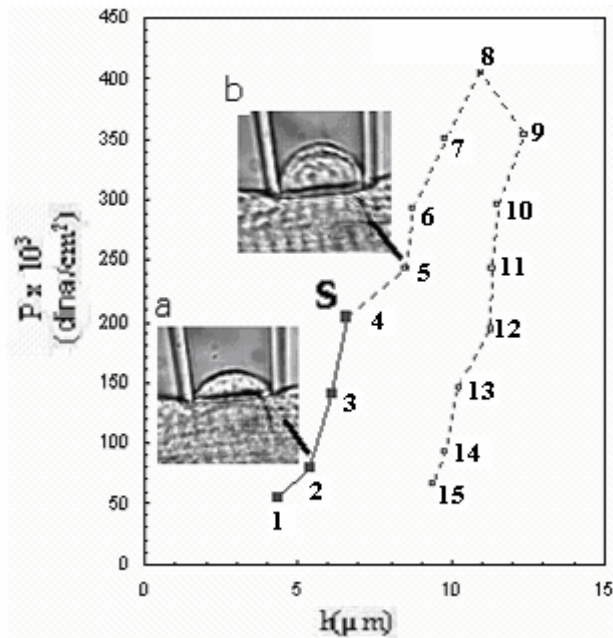


Figura 5.10 Curva **P**-h para una célula muscular única de ratón *mdx*. La **P** se incrementó (líneas continuas y símbolos llenos) y después se disminuyó (líneas segmentadas y símbolos vacíos). **S** denota la **P** de separación del sarcolema de los elementos contráctiles. Como insertos se muestran dos fotografías de los cambios morfológicos de la célula muscular cuando a) el sistema total está como un todo y, b) cuando el sarcolema se ha separado de los elementos contráctiles subyacentes al domo. La curva muestra una región de histéresis. $LS = 3.4\mu m$

La altura h del domo es dependiente de la P de succión. De la curva P - h se pudo obtener la contribución del sistema total conformado por el sarcolema, las costámeras y los elementos contráctiles (primera parte) y; del sarcolema una vez separado éste de los elementos contráctiles subyacentes al domo (tercera parte). La diferencia de la contribución del sistema total y del sarcolema dio la contribución de las costameras.

5.2.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto

Una vez que se midió la h y se calculó la P en cada una de las series de fotografías para cada experimento se generaron las curvas P - h para cada LS seleccionado. Las pendientes de las curvas P - h , en la región ascendente (Figura 5.11, líneas continuas) mostraron una dependencia con la longitud del sarcómero a valores de P antes de la separación. Esto es, para obtener el mismo incremento en h conforme LS variaba, se necesitaron valores de P elevados, lo que sugiere que el aparato contráctil contribuye significativamente a la rigidez del sarcolema en el sistema total en ausencia de la distrofina. Por el contrario, ya que el sarcolema se había separado del aparato contráctil subyacente al domo, solo se registró una pequeña variación en la altura con respecto a la LS , implicando que el aparato contráctil ya no tenía ninguna influencia sobre la elasticidad del sarcolema aislado.

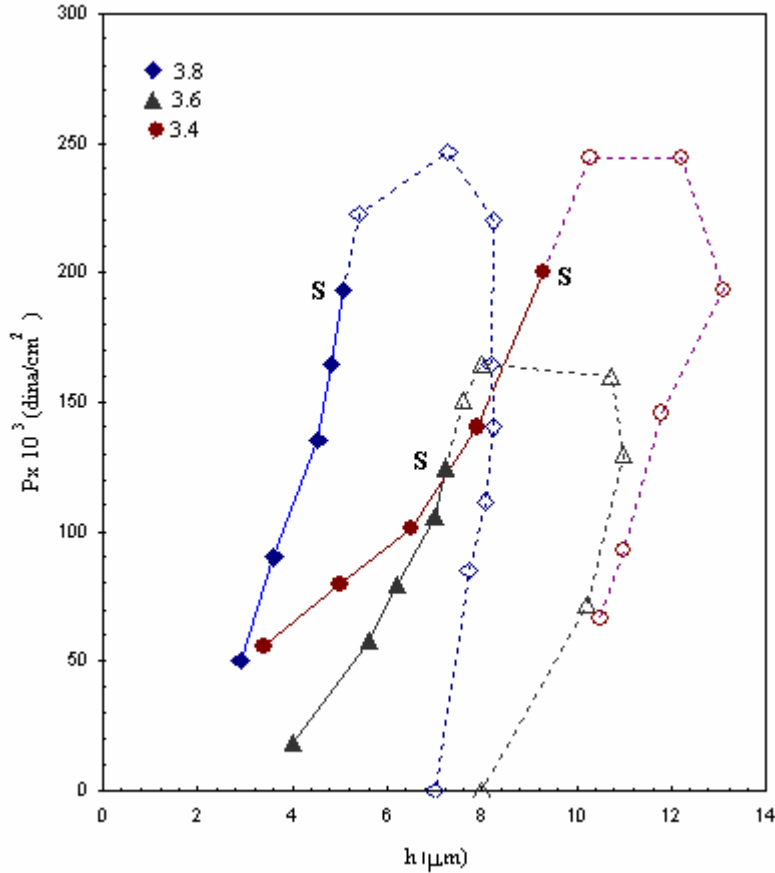


Figura 5.11 Efecto de la LS en la **P** de separación del sarcolema del aparato contráctil subyacente al domo. Se muestran 3 curvas **P-h** a diferente LS en células musculares únicas de ratón *mdx*. Región de la curva antes de la separación (líneas continuas y símbolos llenos) y después de la separación (líneas segmentadas y símbolos vacíos).

De la Figura 5.11 observamos que las pendientes (*m*) de las curvas de ascenso (línea continua) son dependientes de la LS, teniendo que $m_{3.8} > m_{3.6} > m_{3.4}$ lo que hace suponer que aunque la célula muscular carezca de la distrofina, existen otros componentes elásticos, probablemente otras proteínas o bien, un reacomodo estructural, que tienden a apoyar a todo el sistema para que el sarcolema siga realizando su función estructural.

Si la **P** de succión continúa en aumento una vez que el sarcolema se separe de las miofibrillas subyacentes, provocará que el domo limitado por el sarcolema estalle (Figura 5.12). La presión a la que se produce el rompimiento o estallido del sarcolema, **P_{romp}**, es independiente de la LS.

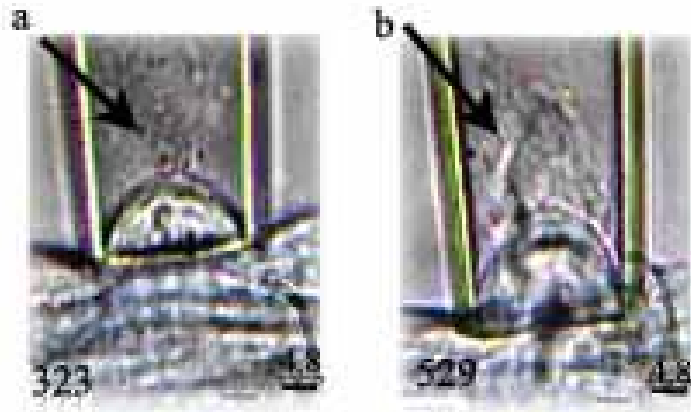


Figura 5.12 Dos fotografías del rompimiento del domo sarcolemal a **P** elevadas para dos experimentos. **LS** = 3.3 (a) y 3.5 (b) μm , **P** en mm Hg está indicado en la parte inferior izquierda.

5.3 Propiedades mecánicas del sistema sarcolema, costameras y miofibrillas en el ratón sin desmina (*des-/-*)

5.3.1 Desplazamiento vertical (h) del domo como función de la presión de succión, P

Cuando se aplica P de succión a través de una micropipeta sobre una pequeña región del sarcolema de la célula única, se genera un domo. La altura del domo es función de la P de succión aplicada y de la LS . La Figura 5.13 muestra una serie de 9 microfotografías para un solo experimento de la formación del domo conforme se incrementaba la P de succión (Figura 5.13 a-e) hasta llegar a la separación del sarcolema de los elementos contráctiles (Figura 5.13 c); y posteriormente la P de succión fue disminuida paulatinamente hasta llegar a 0 (Figura 5.13 f-i). Los parámetros medidos en estas fotografías fueron: la altura h del domo, la LS , el diámetro de la pipeta y el diámetro de la fibra. Una vez obtenido el valor de estos parámetros, se generó la curva de desplazamiento vertical del domo como función de la presión aplicada (P - h) para todas las células musculares examinadas, y así determinar el comportamiento del sarcolema y las miofibrillas subyacentes al domo en función de P . No se observaron cambios significativos en la LS ni en las miofibrillas cercanas que contribuyeran a la formación del domo conforme P aumentaba, lo que sugirió que el sarcolema y las miofibrillas subyacentes mantuvieron su relación estructural. Todas las mediciones realizadas fueron hechas en equilibrio, es decir cuando la altura del domo ya no tenía cambio alguno.

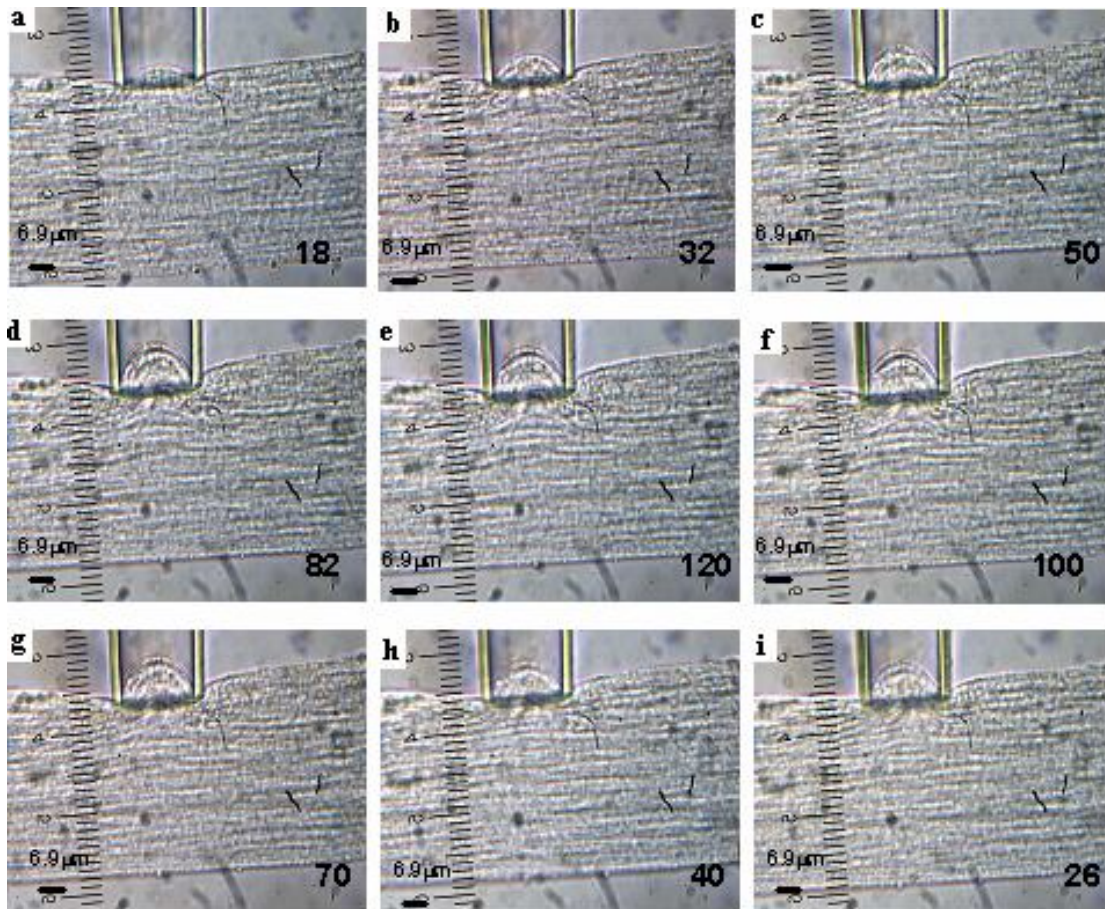


Figura 5.13 Formación del domo a medida que se incrementa **P** en una célula muscular de ratón *des-/-* . El valor de **P** en mm Hg se muestra en la parte inferior derecha de cada fotografía, LS = 3.2μm.

La curva experimental de (**P**-h) (Figura 5.14) para las células musculares de tipo *des-/-* mostró tres regiones. En la primera región (Figura 5.14, puntos 1-4) el sarcolema permanece asociado con los elementos contráctiles subyacentes al domo. La segunda región (Figura 5.14, puntos 5-6) se obtiene conforme se va aumentando la **P** de succión sobre el sarcolema y la curva muestra un cambio negativo en la pendiente mismo que fue ocasionado por la separación física del sarcolema de los elementos contráctiles (punto representado por **S** en Figura 5.14.). La tercera región de la curva fue obtenida al reducir la **P** de succión aplicada a la célula. En esta región se tienen distintos valores de la altura h del domo para la misma **P** antes de la separación. Se tiene la presencia de histéresis en la curva **P**-h, lo que indica que las propiedades mecánicas del sistema son diferentes antes y después del punto de separación **S**.

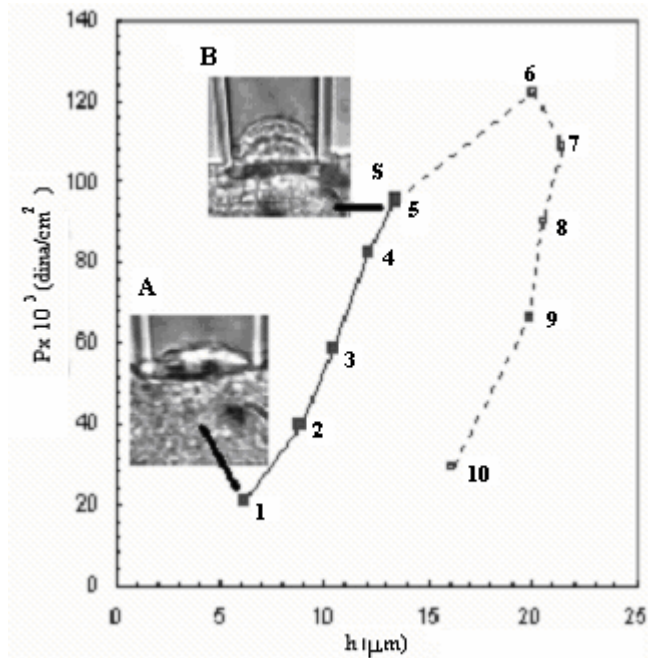


Figura 5.14. Comportamiento de la curva **P-h** para una célula muscular única de ratón *des-/-*. La **P** de succión se incrementó paulatinamente (líneas continuas y símbolos llenos) hasta llegar al punto de separación (**S**) del sarcolema de los elementos contráctiles donde la $P_{sep} = 95 \text{ dina/cm}^2$ y después se disminuyó (líneas segmentadas y símbolos vacíos). Como insertos se muestran dos fotografías de los cambios morfológicos de la célula muscular cuando a) el sistema total está unido, b) cuando ocurre la separación del sarcolema de los elementos contráctiles, subyacentes al domo. La curva muestra una región de histéresis. $LS=3.2\mu\text{m}$

De la curva **P-h** pudimos obtener la contribución del sistema total (primera parte) y del sarcolema (tercera parte). La diferencia de la contribución del sistema total y la del sarcolema dio como resultado la contribución de las costameras. La **P** de succión es dependiente con la altura **h** del domo hasta el punto en el que el sarcolema se separa del aparato contráctil subyacente al domo (denotado por **S**); pasando **S** la pendiente de la curva decrece hasta llegar a la región de histéresis donde la pendiente de la curva decrece aun más y en la tercera región la pendiente se vuelve positiva.

5.3.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto

El dispositivo experimental empleado, permitió estirar longitudinalmente a la célula muscular a una LS deseada y aplicar la presión de succión hasta tener datos suficientes para obtener la curva **P-h** a diferentes LS (Figura 5.15).

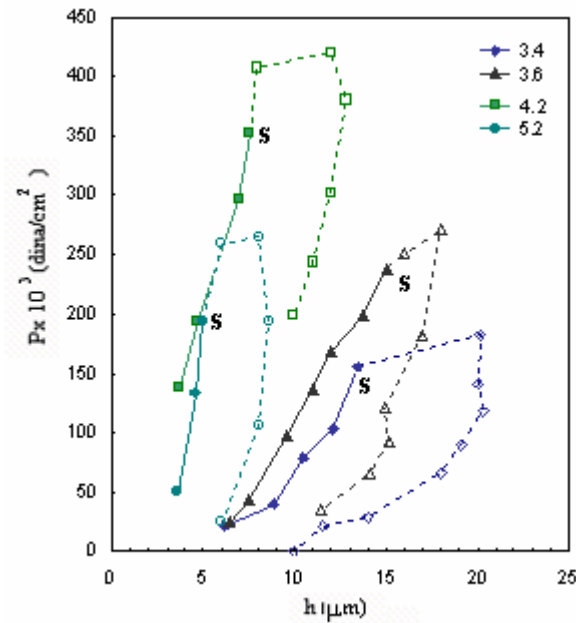


Figura 5.15 Efecto de la LS en la **P** de separación del sarcolema del aparato contráctil subyacente al domo. Se muestran 4 curvas **P-h** a diferente LS en células musculares únicas de ratón *des-/-*. Las líneas continuas y símbolos llenos corresponden al segmento ascendente de la curva antes de la separación por lo que representa al sistema total; y las líneas segmentadas y símbolos vacíos representan al sistema después de la separación.

Habiendo generado las distintas curvas **P-h** para diferentes LS, las pendientes de las curvas **P-h**, en la región ascendente antes de **S** (Figura 5.15, líneas continuas) mostraron una dependencia con la longitud del sarcómero. Es decir, se necesitaron valores de **P** elevados para producir el mismo aumento en **h** conforme LS aumentaba. Lo anterior sugiere que el aparato contráctil contribuye a la rigidez del sarcolema en el sistema total aún en la ausencia de desmina. Como ejemplo, veamos la LS = 4.2 μm donde la presión de separación, $P_{sep} = 355 \times 10^3$ dinas/cm² mientras que a 3.4 μm la $P_{sep} = 164 \times 10^3$ dinas/cm². Este comportamiento no fue el mismo para el caso donde el sarcolema se había separado del aparato contráctil subyacente al

domo, (brazo descendente y línea segmentada de la Figura 5.15) registrando poca variación con respecto la LS, lo que indicó que el aparato contráctil ya no tenía ninguna influencia sobre la elasticidad del sarcolema aislado.

Una vez que el sarcolema se ha separado de los elementos contráctiles subyacentes al domo y si P aumenta, causará que el domo explote (Figura 5.16). La presión a la que se produce el rompimiento o explosión del sarcolema, P_{romp} , es independiente de la LS.

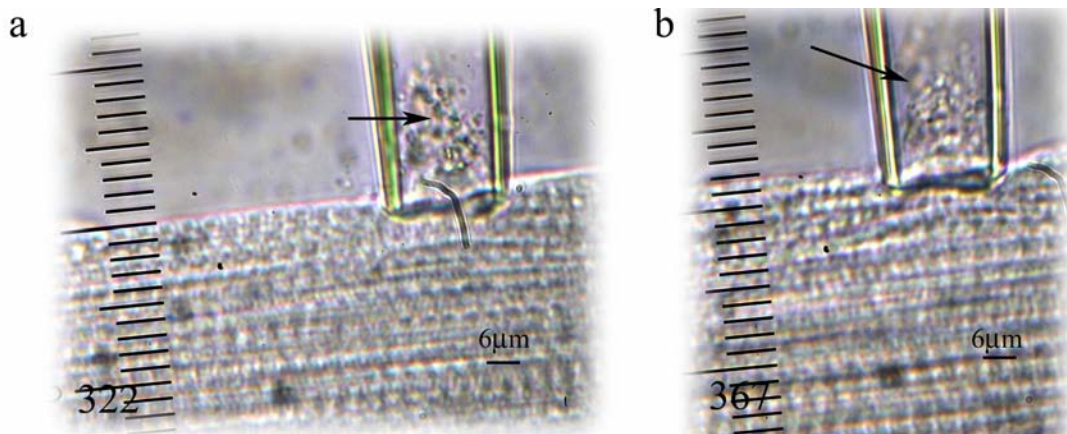


Figura 5.16 Rompimiento del domo sarcolemal en una célula muscular del tipo **des**^{-/-}. Al haber aplicado P elevadas se rompe el sarcolema. a) LS = 3.6 y b) 4.0 μm respectivamente. P en mm Hg está indicado en la parte inferior izquierda de cada microfotografía.

5.4 Comparación de las propiedades mecánicas entre los ratones *WT*, *mdx* y *des*-/-

5.4.1 Desplazamiento vertical (*h*) del domo como función de la presión de succión, *P*

La curva experimental (*P*-*h*) mostró tres comportamientos (segmentos en la curva) diferentes en su desarrollo tanto para el tipo *WT*, como para el *mdx* y para el *des*-/- (Figura 5.17). El primer segmento, sin importar el tipo de célula, está representado por el sistema total formado por el sarcolema, las costámeras y los elementos contráctiles subyacentes. En el segundo segmento, como consecuencia del aumento de la presión, el sarcolema se separó de las miofibrillas a una determinada *P* que es diferente para cada tipo de célula y está denotado por la letra *S*. El último segmento, tras el decremento de *P*, muestra histéresis en la curva *P*-*h*, indicando que las propiedades mecánicas del sistema son diferentes antes y después de la separación, y también representan la contribución del sarcolema solo.

El aparato contráctil contribuye a la rigidez del sarcolema en el sistema intacto, no así para cuando ocurre la separación del sarcolema del aparato contráctil en donde el aparato contráctil ya no tiene influencia en la elasticidad del sarcolema aislado.

La altura *h* del domo es dependiente de la *P* de succión hasta el punto en que el sarcolema se separa del aparato contráctil subyacente al domo, la misma observación es válida para cada uno de los tipos de células musculares estudiados.

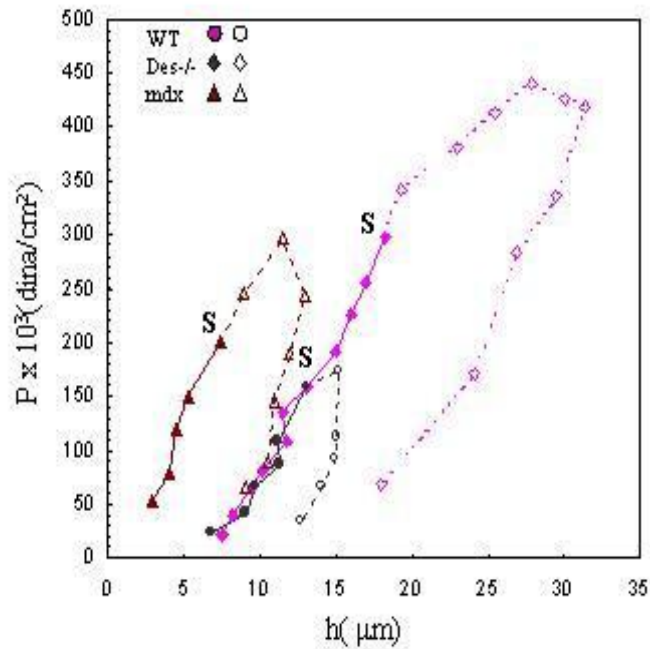


Figura 5.17. Curvas **P**-**h** para células musculares únicas del tipo **WT**, **mdx** y **des -/-** a una **LS** = 3.4μm. Los símbolos llenos y las líneas continuas representan los datos obtenidos antes de la separación del sarcolema de los elementos contráctiles. Los símbolos abiertos y las líneas punteadas representan los datos obtenidos después de la separación del sarcolema de los elementos contráctiles. **S** denota la presión de succión a la cual ocurre la separación.

Para el caso de la **LS** plasmada en la Figura 5.17, los valores para la presión de separación, **P_{sep}**, fueron diferentes para cada tipo de fibra muscular siendo aproximadamente ~2 veces menor en los músculos de ratón **mdx** y **des -/-** que los músculos **WT**. **P_{sep}** = 297 x 10³ dina/cm² en las células musculares **WT**, en las células del tipo **mdx** fue de **P_{sep}** = 200 x 10³ dina/cm² y en el caso de las células del tipo **des -/-** fue de **P_{sep}** = 158 x 10³ dina/cm². Las diferencias que existen entre los distintos valores de **P_{sep}** pueden ser atribuidas a la carencia de ciertas proteínas en la región del complejo costamérico.

5.4.2 Efecto del estiramiento longitudinal de la fibra sobre la P de separación del sarcolema del citoesqueleto

La P_{sep} es función de la LS, observando que a LS mayores las presiones necesarias para separar al sarcolema del aparato contráctil fueron también mayores (Figura 5.18). El cambio en P_{sep} fue mayor a LS de 3.4 a 4.3 μm particularmente para las células de tipo *WT* y *des*^{-/-}.

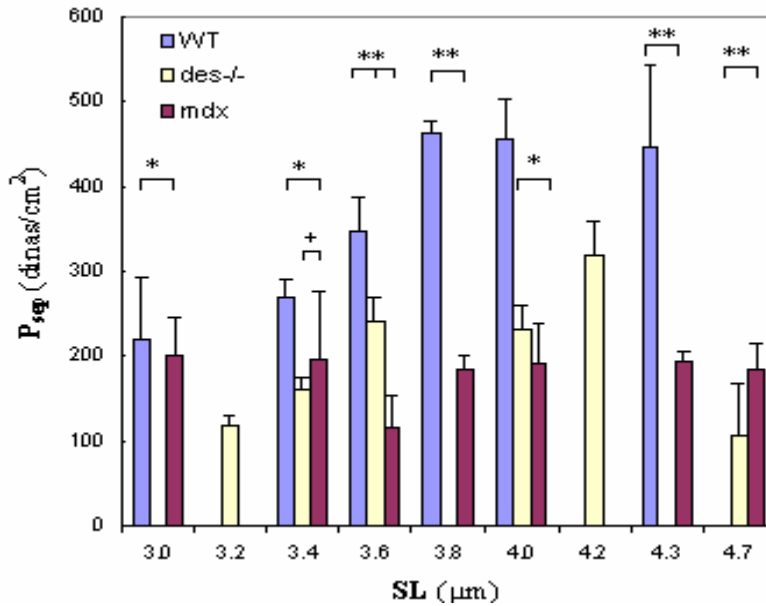


Figura 5.18 Efecto de la LS en la P_{sep} en fibras *WT*, *des*^{-/-} y *mdx*. Las barras indican media \pm DS ** indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.01$, * $p < 0.05$ y + $p < 0.1$ (n=8 para *WT*; n=2 para 3.2, 3.4, 4.0 y 4.7 μm y para 3.6, 4.2 n=3 para *des*^{-/-}; n=5 para *mdx*).

Los valores promedio en las células del tipo *WT* obtenidos para la P_{sep} fueron aproximadamente ~2 veces mayores que en los músculos de ratón *mdx* a LS de 3.6 a 4.3 μm , y ~0.7 veces menor en el ratón *des*^{-/-} a LS de 3.4 a 4.0 μm , lo que indica que las células musculares del tipo *WT* soportan mas presión de succión que las células *des*^{-/-} y *mdx* (Tabla 2).

Una vez que el sarcolema se separa de las miofibrillas subyacentes al domo y se continua aumentando la P de succión, se provocará que el domo sarcolemal explote. La presión a la que se produce la explosión o estallido del domo sarcolemal, P_{romp} , es independiente de la LS (Fig. 5.19 y Tabla 2).

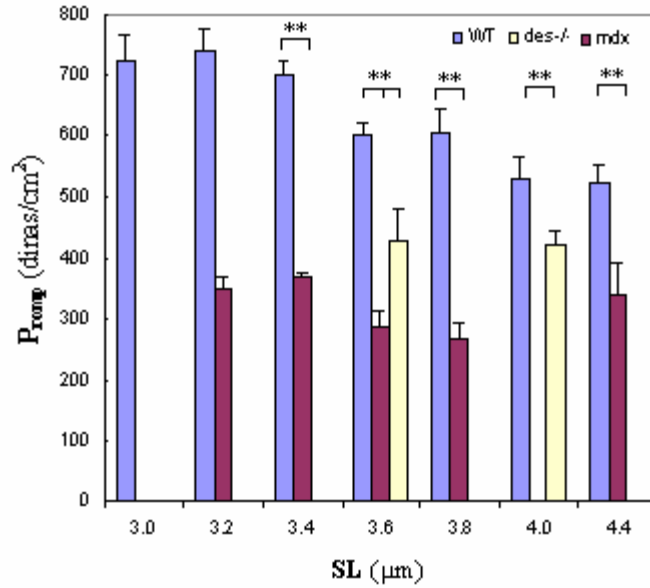


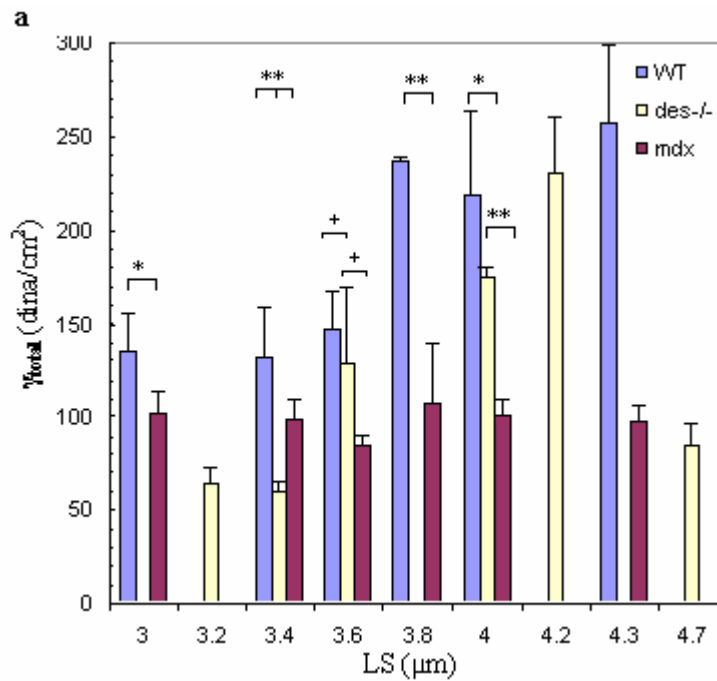
Figura 5.19 Histogramas de la presión de rompimiento P_{romp} , del sarcolema en células musculares *WT*, *des^{-/-}* y *mdx* como función de la LS. Las barras indican la media \pm DS, ** indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.01$; $n = 5$ para *WT*, $n = 3$ para *des^{-/-}* y *mdx*

De la Figura 5.19 notamos que la P_{romp} no depende de la longitud de sarcómero pero si del tipo de célula muscular estudiada lo que indica que una vez que el sarcolema se separó del aparato contráctil subyacente al domo éste ya no contribuye a la tensión generada por el sistema total.

La P_{sep} fue mayor en las células del tipo *WT* que en las *mdx* y *des^{-/-}*, lo que indica que la distrofina por un lado y la desmina por otro, estabilizan al sarcolema además de su posible contribución mecánica en las costameras y sus uniones con las miofibrillas cercanas.

5.4.3 Comportamiento elástico del sistema sarcolema-costameras-miofibrillas de la célula muscular esquelética

Las células musculares esqueléticas del tipo *WT*, *mdx* y *des-/-* se modelaron como un cuerpo elástico conformado por: el sarcolema, las costameras y sus estructuras citoplasmáticas asociadas, y el mioplasma, cada una con sus propiedades elásticas que en conjunto generan las de todo el sistema. En esta sección se compara la tensión (γ) y la rigidez (k) de cada componente del sistema (Figura 5.20 y Tabla 2).



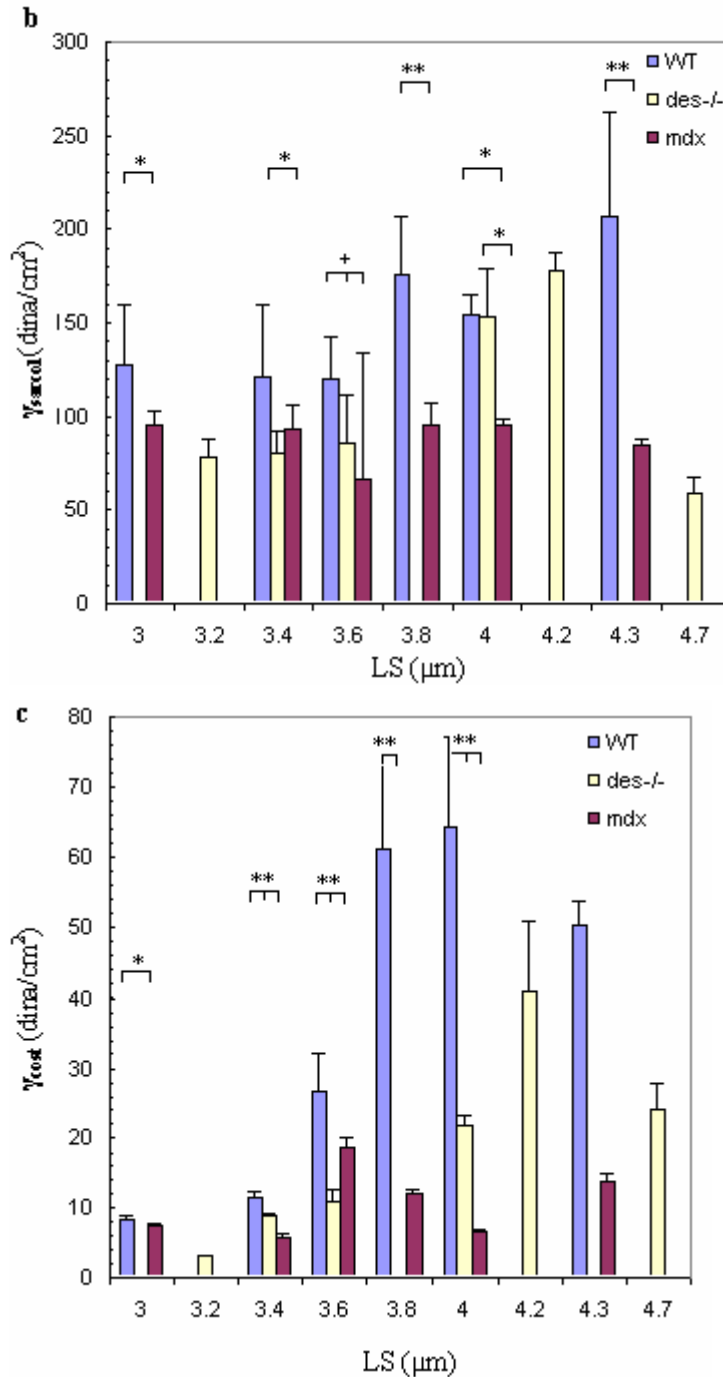
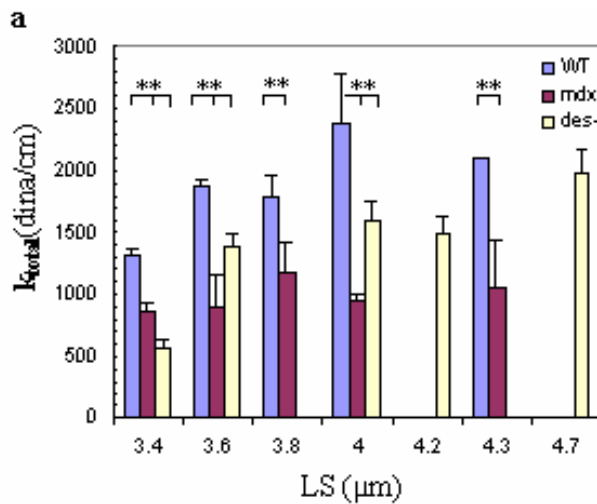


Figura 5.20 Comparación de la tensión superficial (γ) como función de la LS en células musculares *WT*, *des-/-* y *mdx*. Los histogramas muestran a) la tensión total del sistema γ_{total} , b) la tensión del sarcolema γ_{sarcol} , y c) la tensión de las costameras γ_{cost} . Las barras indican la media \pm DS; ** indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.01$; * indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.05$. $n=7$ para *WT*; $n=2$ para 3.2, 3.4, 4.0 y 4.7 μ m y $n=3$ para 3.6, 4.2 μ m para *des-/-*; $n=5$ para *mdx*

La tensión sostenida por el sistema total, por el sarcolema solo y por las costameras de las células *WT* fue mas grande que en las células *des*^{-/-} y *mdx* para todas las LS examinadas ($p \leq 0.05$). γ_{total} incrementó su valor para *WT* y *des*^{-/-} especialmente a valores de $LS > 3.6 \mu\text{m}$, pero no así en el caso *mdx*. De manera similar, γ_{sarcol} para *WT* fue consistentemente mayor que para *mdx* y *des*^{-/-} alcanzando las mayores diferencias a $LS \geq 3.6 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$). Los valores de γ_{cost} en *WT* se incrementaron significativamente a $LS \geq 3.4 \mu\text{m}$ con diferencias de hasta ~5 veces mas grande conforme la LS iba incrementando (Tabla 2). Podemos sugerir que la distrofina es un elemento elástico que une al sarcolema con las miofibrillas y la desmina otro elemento elástico que une a las miofibrillas con la línea Z, los cuales se estiran conforme la LS aumenta. La V de las medidas de γ fue mayor para *WT* que para *mdx* o *des*^{-/-} (Tabla 2).

Se comparó la rigidez (**k**) del sistema total y del sarcolema para las células del tipo *WT*, *des*^{-/-} y *mdx* (Figura 5.21).



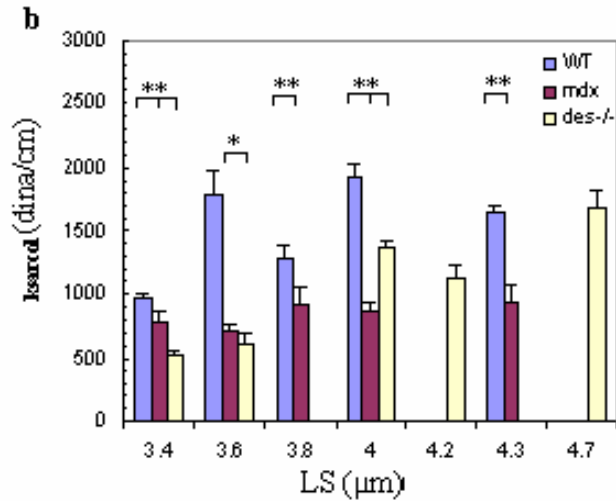


Figura 5.21 Rigidez del a) sistema total k_{total} y, a) del sarcolema, k_{sarcol} . Las barras indican la media \pm DS; ** indica valores significativamente diferentes entre sí, $p < 0.01$; * $p < 0.05$ ($n = 7$ para *WT*; $n=2$ para 3.4, 4.0 y 4.7 μm y $n=3$ para 3.6, 4.2 para *des-/-*; $n=5$ para *mdx*)

Los valores de k mostraron un decremento importante en las células *mdx* (~50%) y en las *des-/-* (~35%) comparados con las *WT* ($p < 0.1$ y $p < 0.05$ respectivamente, Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Valores de P_{sep} , P_{romp} , k_{total} , k_{sarcol} , γ_{total} , γ_{sarcol} , γ_{cost} y las varianzas expresados como la media \pm DS calculados para las LS comunes (3.4, 3.6 y 4.0 μm) en células musculares del tipo *WT*, *mdx* y *des-/-*.

	$P_{sep} \times 10^3$ dinas/cm ²	$P_{romp} \times 10^3$ dinas/cm ²	k_{total} dinas/cm	k_{sarcol} dinas/cm	γ_{total} dinas/cm ²	$V_{\gamma_{total}}$	γ_{sarcol} dinas/cm ²	$V_{\gamma_{sarcol}}$	γ_{cost} dinas/cm ²	$V_{\gamma_{cost}}$
WT	357 \pm 37	601 \pm 20	1856 \pm 171	1564 \pm 103	166 \pm 30	43 \pm 6	132 \pm 24	24 \pm 4	34 \pm 6	4 \pm 1
des-/-	225 \pm 22*	431 \pm 46*	1264 \pm 135*	832 \pm 60*	132 \pm 17*	47 \pm 7	107 \pm 21	28 \pm 5	24 \pm 1*	3 \pm 1
mdx	168 \pm 55*	350 \pm 113*	902 \pm 127*	791 \pm 59*	95 \pm 8*	32 \pm 4	85 \pm 27*	5 \pm 2	10 \pm 1*	1 \pm 1

Capítulo VI

Modelo mecánico elástico equivalente de las proteínas costaméricas desarrollado como un circuito distribuido

6.1 Construcción del modelo elástico distribuido

Modelamos las uniones entre el sarcolema y las miofibrillas, mediados por las costameras, como un modelo distribuido de resortes con constantes elásticas k , que corresponden a los componentes principales de las proteínas costaméricas (Bloch y González-Serratos, 2003). De manera general, existen por lo menos tres complejos que atraviesan el sarcolema en el músculo esquelético al nivel de las costameras (Bloch et. al., 2002; Capetanaki et. al., 2007). Un complejo de adhesión focal que tiene como proteína base a la vinculina (Pardo et. al., 1983), su asociación con la integrina, la laminina y la actina, y está delimitado a las costameras. Otro complejo está compuesto por la β -espectrina en contacto directo con la capa bilipídica y con las proteínas transmembranales vía la anquirina con la ATPasa de Na/K, los canales de sodio y el distroglicano, limitados en la región costamérica y la unión miotendinosa. Y el complejo subsarcolemal conformado por la distrofina y proteínas asociadas (Porter et. al., 1992; Williams y Bloch, 1999; Zubrzycka-Gaarn, 1988), presente a lo largo del sarcolema pero enriquecido en las costameras y que está estrechamente vinculado con la salud del músculo (Hoffman et. al., 1987). En el ratón *mdx*, que carece de la distrofina, los demás integrantes del complejo están disminuidos o ausentes, lo que repercute en la mecánica de las costameras (Lovering et. al., 2005). En el ratón *des^{-/-}*, carente de una proteína de los filamentos intermedios –desmina-, existe evidencia de gran daño mecánico en el músculo (Li et al., 1997).

Nuestro modelo distribuido de resortes (Figura 6.1) asume la presencia de tres uniones importantes entre el aparato contráctil y el sarcolema en la región de las costameras: los filamentos intermediarios basados en la desmina, γ -actina y los filamentos de queratina compuestos por K8 y K19; la distrofina y proteínas asociadas, la sintrofina y la vinculina; y las proteínas transmembranales como las integrinas, canales de Na y sarcoglicanos. En este modelo no tomamos en cuenta la contribución de las proteínas de la matriz extracelular, que incluyen al colágeno IV, el perlecano, la agrina, la fibronectina y la laminina debido a que durante el proceso

de obtención de la célula muscular, la matriz se separa de la lámina reticular que rodea a las células, por lo que estos elementos no contribuyen a la elasticidad del sistema. Tampoco tomamos en cuenta la contribución del aparato contráctil formado por actina y miosina ya que en el dispositivo experimental se fijó la longitud de sarcómero permaneciendo el aparato contráctil a una longitud constante durante el experimento.

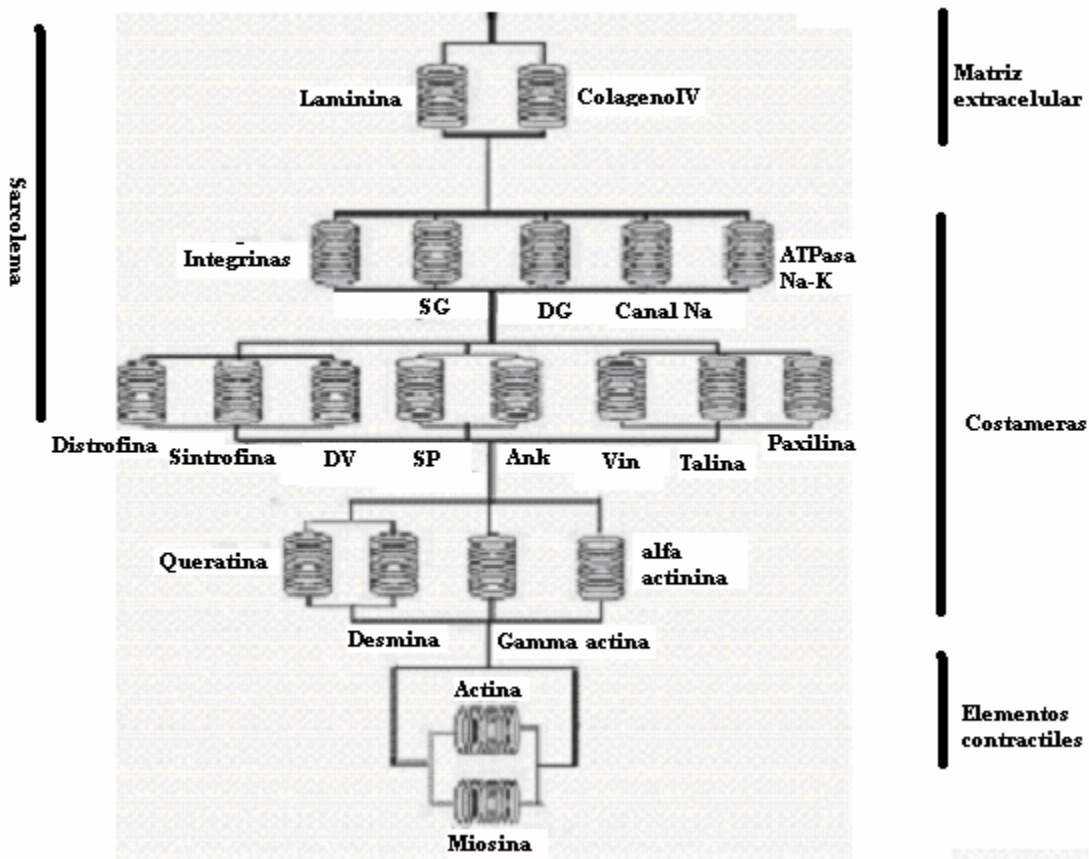


Figura 6.1 Modelo distribuido de resortes compuesto por elementos elásticos en serie y en paralelo que corresponden a las principales proteínas costaméricas. Los resortes no representan el peso molecular de cada proteína que representan. (SG. Sarcoglicano; DG. Distroglicano; DV. Distrobrevina; SP. Sarcospan; Ank. Anquirina; Vin. Vinculina)

6.2 Solución al modelo elástico distribuido

Para poder evaluar el modelo propuesto, tomamos como referencia nuestros resultados experimentales de k_{total} (Capítulo V). Normalizamos el valor promedio de k_{total} para las células musculares de ratones *WT* al valor de 1.0 (Figura 6.2). La k_{total} de las células musculares en ratones *mdx* y *des-/-* obtenidas también experimentalmente, fue tomada como valor relativo a la k_{total} en *WT*, siendo de 0.5 y 0.7 respectivamente (Figura 6.2).

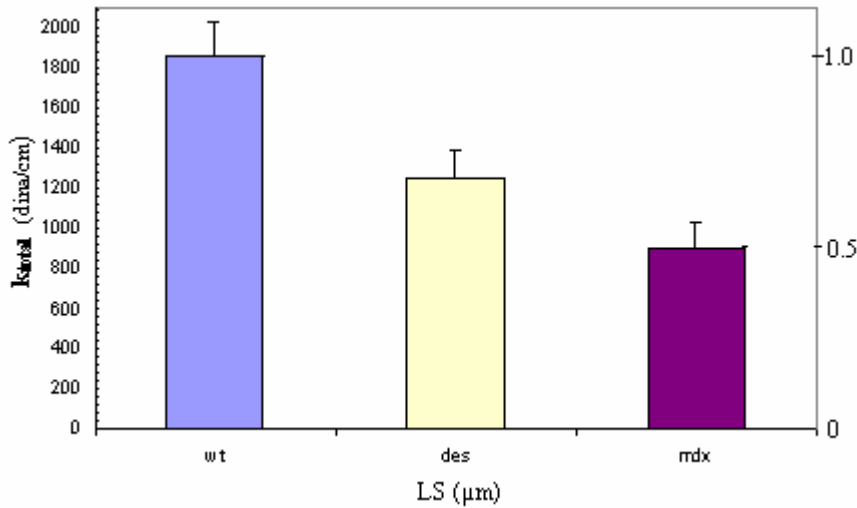


Figura 6.2. Valores k_{total} experimentales (ordenada de la izquierda) y normalizados (ordenada de la derecha) para células musculares de tipo *WT*, *des-/-* y *mdx*.

Para resolver el modelo elástico distribuido y basados en nuestros resultados experimentales de k_{total} para las células musculares de tipo *WT*, *des-/-* y *mdx*, el método numérico tenía que cumplir ciertas condiciones iniciales:

1) La solución del sistema distribuido debe de ser resuelto usando las siguientes ecuaciones:

$$k_{eq \parallel} = k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + \dots + k_n = \sum_{i=1,2,\dots,n} k_i \quad (1)$$

Donde $k_{eq \parallel}$ es el valor de la constante de rigidez equivalente (k_{eq}) para dos o mas resortes en paralelo

$$k_{eq\ serie} = \frac{k_1 k_2 k_3 \dots k_n}{\sum_{i=1,2,\dots,n} k_i} \quad (2)$$

Donde $k_{eq\ serie}$ es el valor de la constante de rigidez equivalente (k_{eq}) para dos o mas resortes en serie.

2) Se resuelven todos los componentes elásticos que estén en paralelo y así se obtiene k_{1eq} , k_{2eq} y k_{3eq} que a su vez están en serie. La solución de este sistema en serie da $k_{eqtotal}$, valor que se va a comparar con la k_{total} obtenida experimentalmente (Figura 6.3).

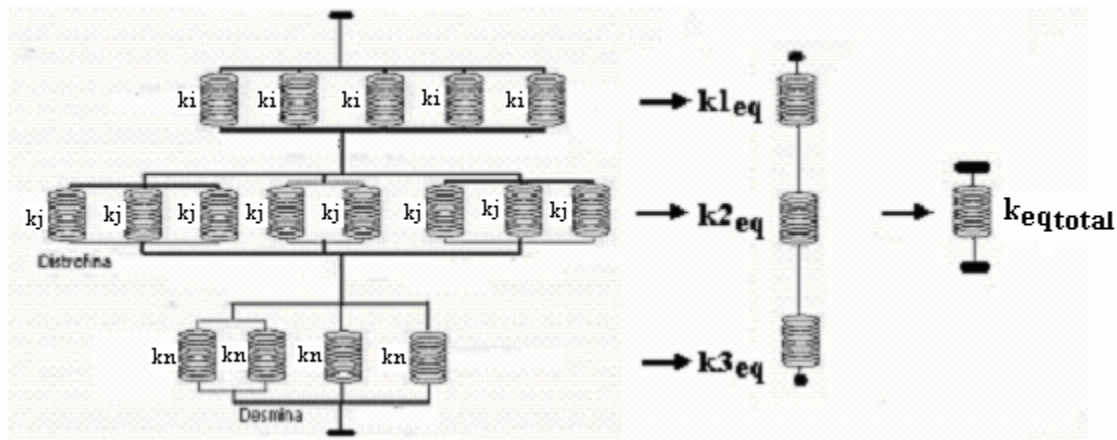


Figura 6.3 Pasos que se siguen para resolver el modelo elástico distribuido. Se obtienen los valores para cada resorte en paralelo de k_i , k_j y k_n ; se obtiene una k_{1eq} , k_{2eq} y k_{3eq} que están conectados en serie y tras resolverlos dan como solución $k_{eqtotal}$.

3) Ahora se resuelve el modelo elástico distribuido para el caso **WT** donde todos los componentes elásticos están presentes, estableciendo así los valores iniciales de k . Luego se resuelve el modelo para los casos **des-/-** y **mdx** indistintamente. Al resolver los casos donde hay ausencia de alguna proteína, se mantienen constantes los valores de k obtenidos para el **WT** a excepción del caso de **des-/-** donde se omite el valor de k asignado a la desmina; y para el caso **mdx** se omite el valor asignado a la distrofina, pero es este caso las proteínas asociadas a la distrofina como el distroglicano, los sarcoglicanos, el sarcospan, la sintrofina y la distrobrevina están disminuidas (5), por lo que los valores de k para estas proteínas deben de ser diferentes que los valores obtenidos para el caso **WT**.

4) Si al haber resuelto el modelo distribuido de resortes mediante la ecuación 1 y 2 no se está en conformidad con los valores experimentales de k_{total} 1.0, 0.7 y 0.5 para *WT*, *des-/-* y *mdx* respectivamente, las soluciones individuales de k_i , k_j y k_n son rechazadas, volviendo a efectuar el procedimiento de iteración.

Los valores resultantes de la iteración se muestran en la Tabla 6.1

Tabla 6.1 Valores de k obtenidos en la iteración

Proteína	k	Proteína	k	Proteína	k
Laminina	0.0	Distrofina	1.9	Desmina	1.1
Collageno IV	0.0	Sintrofina	0.1	Queratina	1.0
Distroglicano	0.5	Distrobrevina	0.2	α -Actinina	0.8
Sarcoglicano	0.6	Espectrina	0.1	γ -Actina	1.0
Integrina	0.4	Anquirina	0.2	Actina	0.0
NaK ATPasa	0.3	Vinculina	0.2	Miosina	0.0
Canal Na	0.2	Talina	0.1	Paxilina	0.2

Tras la iteración de los valores individuales para cada proteína representada en el modelo (Tabla 6.1), se pudo resolver el circuito distribuido obteniendo un valor teórico de 0.9 para el caso de *WT*. Para el caso en el que solo se removió a la desmina, dejando los demás valores de k_i , k_j y k_n inalterados, el valor teórico fue de 0.8. Cuando solo se removió la distrofina se obtuvo un valor teórico de 0.5 (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Comparación de k_{total} y $k_{eqtotal}$.

	Valores	
	Experimentales	Teóricos
	k_{total}	$k_{eqtotal}$
<i>WT</i>	1.00	0.92
<i>Des -/-</i>	0.68	0.84
<i>mdx</i>	0.48	0.52

Aunque las diferencias fueron del orden del 10% para el ratón *WT* y *mdx*, el valor que se tuvo para el caso *des-/-* fue del 23%; lo que sugiere que la carencia de otros elementos (proteínas) al sistema pudiera dar pie a la explicación de este 23% de diferencia, o bien que la distribución de los elementos elásticos pudiera tener otra configuración o bien, que la ausencia de desmina causa alteraciones en los demás elementos elásticos.

Esto sugiere que, aunque es un modelo elástico distribuido simplificado resuelto por métodos computacionales, proporciona una buena aproximación de la distribución y de las constantes elásticas de las proteínas que forman las costameras.

Los valores obtenidos de $k_{eqtotal}$, basados en el modelo, sugieren que cuando la distrofina está ausente, la membrana se vuelve mas débil y plástica ($k \ll \ll 1$); y que cuando la desmina está ausente la membrana es elástica ($k < 1$) pero no tanto como en el caso **WT** ($k = 1$).

Capítulo VII

Discusión y conclusiones

El método del elastómetro empleado en este trabajo, nos permitió estudiar las propiedades biomecánicas de la membrana de células maduras del músculo EDL de murino, aunque puede ser fácilmente modificado para el estudio de células con mayor o menor rigidez. Una gran ventaja de este método es que la geometría y la tensión de la membrana se pueden controlar durante las medidas experimentales y por ende cuantificar los cambios en el área de la membrana como función de la presión de succión aplicada (Needham y Hochmuth, 1992). Otros métodos como las pinzas ópticas, el microscopio de fuerza atómica, la inserción de perlas de oro o látex en la célula, o la ablación láser pueden proporcionar parámetros biomecánicos de la célula, pero son inadecuados para obtener la presión de separación del sarcolema de sus estructuras subyacentes así como tampoco podemos obtener la presión de rompimiento del sarcolema. El elastómetro no es invasivo y no requiere de fijar a la célula como en el caso del microscopio de fuerza atómica; o, las pinzas ópticas que aunque brindan información muy precisa no son útiles en este tipo de células ya que el intervalo de fuerzas que miden oscila entre 50 a 5000 pN además de que el área de trabajo es de tan solo unas pocas micras; o, para insertar las perlas de oro o látex se requieren de hacer agujeros de 1 a 100 μm dependiendo del diámetro de la perla lo que ocasionaría condiciones indeseables en la célula muscular; y, la ablación láser produce cortes a temperaturas tan altas que la célula de estar in vivo le ocasionaría necrosis.

Los resultados obtenidos con el uso del elastómetro, indican que la elasticidad y estabilidad del sarcolema están altamente comprometidas en la ausencia de distrofina y en menor proporción en la ausencia de desmina.

Nuestros experimentos fueron los primeros en determinar las propiedades biomecánicas del sarcolema y de las costameras. Esto, se logró mediante el estudio de las propiedades del sarcolema mientras estaba unido al aparato contráctil y después de la separación de éste de las estructuras contráctiles. Las propiedades del sarcolema fueron

independientes de la LS (Figura 5.25). La comparación entre estas condiciones, sugiere que el 80% de la rigidez intrínseca a la superficie de la célula se debe al sarcolema junto con sus estructuras asociadas, incluyendo al citoesqueleto y la membrana basal. Sin embargo, la rigidez del sistema total conformado por el sarcolema, las estructuras contráctiles subyacentes y las costámeras si es dependiente de la LS, ya que cuando se incrementa LS también se incrementa la rigidez (Tabla 3 y Figura 5.21); lo que es consistente con la idea de que mucha de la fuerza contráctil en el músculo esquelético sigue el camino lateral de la transmisión de fuerza (Street, 1983; Bloch y González-Serratos, 2003).

Los estudios que realizamos, identificaron por primera vez el papel que desempeña la distrofina y la desmina en la determinación de las propiedades biomecánicas del sarcolema junto a sus estructuras contráctiles subyacentes y, las del sarcolema inmediatamente después de la separación de los elementos contráctiles. Nuestras mediciones mostraron que la presión necesaria para separar al sarcolema de las estructuras contráctiles subyacentes, P_{sep} , así como la presión necesaria para que el sarcolema explote, P_{romp} , en los casos donde no hay distrofina ni desmina en el músculo EDL es menor que en la condición normal. Estos resultados sugieren que el sarcolema de los músculos que carecen de distrofina ceden mas, es decir, son mas plásticos, menos rígidos y menos estables que los normales. No así los de desmina que al compararlos con los distróficos ceden menos y son menos flexibles, pero no tanto como los normales. No podemos dejar de lado la posibilidad de que la ausencia de distrofina o de desmina conlleve a cambios secundarios en el sarcolema o en la matriz extracelular, incluyendo en la lamina basal, las fibras de colágeno u otras proteínas de la lamina reticular que puedan afectar las propiedades biomecánicas. Sin embargo nuestros resultados sugieren que la distrofina si estabiliza al sarcolema como otros autores han propuesto (Lovering et. al., 2005), y que participa en la unión entre la membrana y el aparato contráctil en la región costamericana; además la desmina le da integridad a la estructura del sarcómero y participa en la transmisión de fuerza (Capetanaki y Milner, 1998). Estudios hechos por Rybakova et. al., (2000) en segmentos aislados de sarcolema en músculos sin distrofina muestran

que la distrofina se asocia con el sarcolema cuando éste es mecánicamente retirado del aparato contráctil.

Fuimos capaces de deducir algunas de las propiedades biomecánicas de las costameras por medio de la comparación entre las propiedades del sarcolema solo y unido al aparato contráctil subyacente. Nosotros encontramos que las costameras y sus uniones entre el sarcolema y el aparato contráctil de los cuales sirven como unión son significativamente débiles en comparación con el sarcolema solo, contribuyendo solamente un ~20% a la rigidez observada en el sistema intacto. Como la distrofina está localizada en un mayor porcentaje en las costameras (Porter et al., 1992; Straub et. al., 1991; Ervasti, 2003) no es inesperado haber encontrado que en los músculos de ratones *mdx* la fuerza entre estas conexiones esté muy comprometida. Otras proteínas también interactúan con la distrofina para establecer estas conexiones como la γ -actina, los filamentos intermediarios compuestos por desmina y queratinas, entre otras (Rybakova et al., 2000; O'Neill et. al., 2002; Stone et. al., 2007). La desmina no es necesaria en la miogénesis del músculo, pero si es necesaria para la generación óptima de la fuerza. Cuando la desmina está ausente en el músculo, existe una reducción significativa en la función muscular (Agbulut et al., 2001; Balogh et al., 2002; Balogh et al., 2003; Sam et al., 2000; Shah et al., 2001). Podría pensarse en hacer estudios similares a los aquí realizados, pero con músculos de ratones carentes de otras proteínas costaméricas para elucidar la contribución de éstas en la estabilidad de las costameras y su conexión con el sarcolema y los elementos contráctiles.

Se hizo un análisis de la varianza, V de nuestros valores para P_{sep} brindando información adicional acerca de la naturaleza de las costameras y sus conexiones con el aparato contráctil. La varianza de P_{sep} como función de la LS es considerablemente menor en las células *mdx* que en las *WT* (100 ± 10 en *WT*, 9 ± 3 en *mdx* y en 63 ± 8 en *des-/-*) a diferencia de las *des-/-* cuya varianza tiene un valor entre las dos anteriores. Esto indica que si un elemento elástico importante, como la distrofina, está ausente, entonces el sistema se vuelve mas flexible, es decir cede mas. Y, para el caso en el que la desmina está ausente, el sistema no es tan flexible pero si entra a la fase elástica. Cuando el

sarcolema está conectado al aparato contráctil subyacente a través de las costámeras, y si se estiran éstas conexiones, se producirá un mayor cambio en la fuerza si se compara con el caso en que estas conexiones están rotas, y esto a su vez producirá un valor mas grande de la varianza.

Los primeros experimentos que se hicieron para medir la tensión (γ) del sarcolema fueron realizados por Rapoport (1972) en el músculo semitendinoso de rana. Al comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos en el estudio de Rapoport de la Rana pipiens, sugieren que su sarcolema es más débil que la del músculo EDL de ratón. A LS de $4\mu\text{m}$, Rapoport (1972) midió la tensión promedio obteniendo un valor de 45 dina/cm en la rana. Nuestros valores son de 3 a 5 veces mayores que los de rana, probablemente la diferencia sea causada por la temperatura (22°C comparada con 8°C que se empleó en el presente estudio) que afecta a la tensión superficial (Bull, 1964). Estudios realizados en fibras únicas de EDL de ratón, a diferente temperatura indican que el valor del coeficiente de temperatura, Q_{10} , para la tensión superficial es ~ 3.9 lo que no es suficiente para explicar las diferencias entre la tensión de rana y ratón. La diferencia de γ entre las células musculares de EDL de ratón se atribuye probablemente a la presencia de las costameras, estructuras del músculo estriado de mamíferos que unen las miofibrillas superficiales con el sarcolema al nivel de los discos Z y las bandas M, y los elementos longitudinales. En contraste, en las miofibrillas del semitendinoso de rana solo están las costameras al nivel de los discos Z (Street, 1983; Gonzalez-Serratos comunicación personal sin publicar). La presencia de un mayor número de uniones entre las miofibrillas superficiales con el sarcolema en los músculos EDL tiene como consecuencia que la superficie de la membrana sea mas rígida, que ceda menos y que tenga γ mas grandes. Un buen porcentaje de la fuerza activa es transmitida lateralmente a través de las costameras hacia los tendones (Street, 1983; Bloch y Gonzalez-Serratos, 2003) existiendo mayor densidad costamérica en las fibras musculares de mamífero; motivo por el que se explica el porque una sola fibra de flexor Digitorum brevis de murino genera una fuerza específica de 362 kPa (Allen et. al., 2008) comparada con los 275 kPa de una fibra aislada de anfibio (Gordon et. al., 1966), ambos a una LS óptima.

Las fotografías del trabajo de Williams y Bloch, (1999) sugieren que las costameras cubren aproximadamente la mitad de la superficie de la membrana en fibras rápidas. A una LS de 2.9 o 3.6 μm , la presión ejercida sobre el sarcolema justo antes de que se separe del aparato contráctil es de aproximadamente 2.6×10^6 kPa. Si ésta presión se distribuye de manera uniforme sobre las costameras, entonces la presión ejercida en las uniones entre el aparato contráctil y el sarcolema, presente en las costameras, será de aproximadamente dos veces su valor o aproximadamente 5.2×10^6 kPa. Trabajos previos afirman que durante una contracción tetánica máxima la presión lateral ejercida en el sarcolema es de aproximadamente 6×10^2 kPa (Bloch y Gonzalez-Serratos, 2003), indicando que las costameras tienen un factor de amortiguamiento de varias ordenes de magnitud que podrían hacer posible que durante la contracción muscular normal o una contracción máxima éstas no se rompan. La fuerza tensil del mayor componente de los filamentos intermedios, la desmina, a un estiramiento del 240% más de su longitud inicial fue de 28×10^3 kPa (Kreplak et. al., 2008) valor que también podría contribuir al factor de amortiguamiento de las costameras durante la contracción muscular. Sin embargo, en condiciones de distrofia muscular, como la que se presenta en los músculos de ratón *mdx*, que son mas débiles, las costameras son a pesar de todo suficientemente fuertes para soportar la actividad contráctil.

El daño ocasionado al sarcolema durante la contracción muscular, se debe probablemente a las regiones intercostaméricas, que son una zona donde muchas de las estructuras protéicas están ausentes pero que son apoyadas mecánicamente por las propias costameras (Williams y Bloch, 1999). El hecho de que la distrofina y sus proteínas asociadas estén presentes en las regiones intercostaméricas de los músculos normales, pero no en los músculo *mdx* (Williams y Bloch, 1999) puede dar pie a la enorme susceptibilidad que existe al momento de la actividad muscular. La desmina, la mayor proteína de los filamentos intermedios, solo está presente en la línea Z (O'Neill et. al., 2002), por lo que la poca susceptibilidad que tienen los ratones *des*^{-/-} durante la actividad muscular, pueda estar relacionada con su ausencia en la región intercostamérica pero relacionada con la organización sarcomérica. Esto es consistente con el hecho de que las proteínas de la membrana del esqueleto siguen asociadas al sarcolema en ausencia de desmina y

sugiere que la estabilidad del sarcolema no está comprometida en su ausencia. Shah *et al.* (2004) sostienen que la desmina es importante para mantener la posición del núcleo y de la mitocondria así como para la transmisión de fuerza a través del citoesqueleto, pero no es esencial para transmitir la fuerza del sarcómero a la matriz extracelular.

Varios autores han usado el método de aspiración por micropipetas para medir la tensión γ en la superficie celular de diferentes células. En los neutrófilos, Needham y Hochmuth (1992) basados en datos teóricos extrapolaron la tensión en una membrana en reposo a temperatura ambiente y obtuvieron una $\gamma=2.4 \times 10^{-2}$ dina/cm; de manera similar Tsai *et. al.* (1993) reportó un valor de 2.7×10^{-2} dina/cm. En granulocitos, Evans y Young (1989) encontraron $\gamma= 3.5 \times 10^{-2}$ dina/cm, mientras que Trans-Son-Tay *et. al.* (1991) reportaron un valor de 2.4×10^{-2} dina/cm. En fibroblastos de embriones de pollo, Thoumine *et. al.* (1999) y Rand (1964) encontraron una tensión máxima de $\gamma=2.4$ dina/cm, mientras que Waugh y Evans (1979) reportaron un valor de $\gamma= 6.6$ dina/cm. Hutter *et al.* (1991) midieron la tensión en vesículas aisladas de sarcolema conocidas como “sarcobolas” obtenidas del músculo semimembranoso expuesto a KCl y colagenasa a temperatura ambiente. Ellos reportaron una tensión de rompimiento promedio de 6 dina/cm en las sarcobolas de las células del ratón normal y de 5.2 dina/cm en sarcobolas de músculo de ratón *mdx*. La diferencia es mas pequeña que la mostrada por nuestros resultados. Probablemente, ésta diferencia se deba al hecho de que las sarcobolas son esferas compuestas puramente de sarcolema y que muchas de las proteínas membranales como la distrofina entre otras, fueron retiradas de la superficie citoplasmática del sarcolema al momento de la formación de las sarcobolas. Lovering *et. al.*, (2011) encontraron que la tensión específica en el músculo entero de TA carente de desmina disminuyó en un 40% al compararse con el ratón normal. La diferencia, la cual es mayor que la mostrada por nuestros resultados sea debida probablemente a que tales autores usaron el músculo entero en donde existen elementos elásticos adicionales a la célula aislada. Sam *et. al.*, (2000) reportaron una diferencia del 12% en la tensión de los músculos EDL enteros de ratón *des-/-* y normales, además de que encontraron que los músculos *des-/-* eran mas resistentes al daño mecánico. Esta diferencia en tensión, es

menor comparada con la nuestra probablemente por que realizaron un protocolo de contracciones isométricas para medir la tensión.

Usando un método diferente, Pasternak y colaboradores (1995) reportaron que la rigidez en miotubos del tipo *mdx* fue de 3.4 dina/cm, varias veces menor que el valor obtenido para los controles siendo de 12.3 dina/cm. Los miotubos carecen de organización en el aparato contráctil y no necesariamente se forman las costameras (resultados sin publicar de R. J. Bloch; Quach y Rando, 2006) así que el hecho de que se hayan obtenido valores para la γ con un orden de magnitud menor a los aquí reportados no es del todo sorprendente. Pasternak (1995) usó células cultivadas en las que para medir la LS usó rodillos de vidrio insertados en el sarcolema, cosa que evitó tener una distribución homogénea de las caveolas en la membrana conforme ésta se iba deformando. Estos dos factores contribuyeron a la obtención de valores de γ menores comparados con los nuestros. Los valores de γ que nosotros reportamos para el sarcolema en las células musculares se deben a la presencia del citoesqueleto y a las estructuras que lo unen con el aparato contráctil (Porter et. al., 1992; Williams y Bloch, 1999a; Hutter et. al., 1991; Na et. al., 2009). El hecho de que la rigidez en la superficie de las miofibras en nuestros experimentos sea ~100 veces mas grande que los miotubos normales o los *mdx* (Pasternak et. al., 1995) va relacionado con la idea de que la estabilidad del sarcolema está relacionada a otros factores a parte de la ausencia de distrofina, mismos que también juegan un papel importante en la determinación de las propiedades biomecánicas de la superficie de la célula muscular y sobre todo para la salud del músculo. Anderson et. al., (2002) reportaron un incremento en la rigidez del músculo soleus entero de *des*^{-/-}. La diferencia con nuestros resultados en donde la rigidez disminuyó (~30%), se puede deber probablemente al tipo de músculo empleado y la cantidad de tejido conectivo encontrado en todo el músculo a diferencia del poco o nulo que existe en una célula muscular. El protocolo que ellos usaron para calcular la rigidez, se basó en analizar la tensión pasiva mediante una prueba de estiramientos del tipo rampa-meseta que difiere sustancialmente con el nuestro.

Bobet et al., (1998) y Wolff et al., (2006) reportaron que no hay diferencias en las propiedades mecánicas pasivas ni en las propiedades contráctiles del músculo EDL entero de ratón normal o *mdx*. Es difícil hacer una comparación entre los resultados obtenidos del músculo entero con células aisladas; ya que existen elementos elásticos adicionales en el músculo entero que no se encuentran en las células aisladas, algunos de los cuales causarían aumento en la γ del músculo *mdx* (Goldspink et. al., 1994). Grange et. al., (2002) encontraron que el sarcolema de los músculos de ratón *mdx* de entre 9 a 12 días también son más susceptibles a ceder más a los esfuerzos ocasionados por un estiramiento que provoca daño. Nosotros encontramos que la superficie de las fibras *mdx* tiene mayor plasticidad y ceden mas fácilmente que los controles, probablemente ocasionada por los cambios en la matriz extracelular y otras estructuras que se encuentran entre las miofibras de los ratones *mdx*. Los músculos de ratón *des-/-* se fatigan mas rápidamente que los músculos control; aunado a esto el músculo soleus, que tienen abundancia en mitocondrias, muestra daños aun sin ningún protocolo de ejercicio (Li et. al, 1997). Por el contrario, los músculos EDL de ratones *des-/-* son menos vulnerables al daño ocasionado por las contracciones excéntricas comparado con el ratón normal (Sam et. al., 2000).

La distrofina brinda estabilidad mecánica al sarcolema y está involucrada en la transmisión de fuerza entre el aparato contráctil y la matriz extracelular; por lo que la ausencia de distrofina lleva como consecuencia un decremento en la transmisión de la fuerza lateral pasiva y activa, vinculada a cambios en las propiedades de las costameras y el aumento de la plasticidad en las células de ratón *mdx* (Street, 1983; Bloch y Gonzalez-Serratos, 2003). El importante papel que juega la desmina en la fuerza lateral, en la organización de organelos como el núcleo y la mitocondria y la alineación del sarcómero puede ser mas importante que su papel en la protección de los daños ocasionados por la contracción; por lo que en los ratones *des-/-* se fatigan mas rápido, y son menos vulnerables al daño (Paulin y Li, 2004; Capetanaki et. al., 2007; Lovering et. al., 2011).

El modelo elástico distribuido puede ser usado para predecir lo que la ausencia o disminución de alguna proteína que conforma a las costameras puede ocasionarle al sarcolema, y

también ser comparado con modelos animales conforme éstos se encuentren disponibles. Sin embargo, la diferencia del 20% de los valores experimentales con los teóricos en el caso de la desmina sugiere que la ausencia de ésta proteína causa alteraciones en los demás elementos elásticos; no siendo tan significativo para el caso control o *mdx*.

La siguiente etapa de este trabajo de investigación será estudiar el papel que juegan otras proteínas enriquecidas en la región costamérica, con el objetivo de desarrollar un modelo físico de estas estructuras y como es que éstas contribuyen a la transmisión de fuerza lateral. De igual forma entender la manera en la que funciona el sarcolema normalmente, y cómo sus funciones se ven comprometidas como ya lo demostramos experimentalmente en el músculo pero ahora con ayuda de imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia.

Capítulo VIII

Bibliografía

Adams E, Cramarcy N, Krall S, Rossi S, Rotundo R, Sealock R, Froehner S. Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J. Cell Biol.* 150:1385-1398 (2000)

Agbulut O, Li Z, Perie S, Ludosky MA, Paulin D, Cartaud J, Butler-Browne G. Lack of desmin results in abortive muscle regeneration and modifications in synaptic structure, *Cell Motil. Cytoskeleton* 49: 51-66 (2001)

Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal Muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol. Rev.* 88: 287-332 (2008)

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The molecular biology of the cell.* Garland Science, New York. 3a edición (2007)

Anastasi G, Cutroneo G, Santoro G, Arco A, Rizzo G, Bramanti P, Rinaldi C, Sidoti A, Amato A, Favaloro A. Costameric proteins in human skeletal muscle during muscular inactivity. *J Anat.* 213(3):284-295. (2008)

Anderson J, Li Z, Goubel F. Models of skeletal muscle to explain the increase in passive stiffness in desmin knockout mice. *J. Biomech.* 35:1315-1324 (2002)

Ayalon G, Davis J, Scotland P, Bennett V. An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* 135 (7):1189-1200. (2008)

Balogh J, Merisckay M, Li Z, Paulin D, Arner A. Hearts from mice lacking desmin have a myopathy with impaired active force generation and unaltered wall compliance. *Cardiovasc. Res.* 53(2):439-450 (2002)

Balogh J. Desmin Filaments influence myofilament spacing and lateral compliance of slow skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 88:1156-1165 (2005)

Bär H, Strelkov S, Sjoberg G, Aebi U, Herrmann H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organization? *J. Struct. Biol.* 148:137-152 (2004)

Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. *Ganong Fisiología médica.* Mac Graw Hill Lange. 23ª edición. (2010)

Barton E. Impact of Sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290(2):C411-C419 (2006)

Bhosle R, Michele D, Campbell K, Li Z, Robson R. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346(3):768-777. (2006)

Blake D, Weir A, Newey S, Davies K. Function and genetics of Dystrophin and Dystrophin-related Proteins in Muscle. *Physiol. Rev.* 82:291-329 (2002)

- Blaauw B, Mammucari C, Toniolo L, Agatea L, Abraham R, Sandri M, Reggiani C, Schaffino S. (2008) Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum Mol. Genet.* 17(23): 3686-3696. (2008)
- Bloch R, Capetanaki Y, O'Neill A, Reed P, Williams McR, Resneck W, Porter N, Ursitti J. Costameres: Repeating Structures at the Sarcolemma of Skeletal Muscle. *Clin. Orthop.* 403S:S203-S210 (2002)
- Bloch R, Gonzalez-Serratos H. Lateral Force Transmission Across Costameres in Skeletal Muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 31 (2):73-78 (2003)
- Bloch R, Reed P, O'Neill A, Strong J, Williams M, Porter N, Gonzalez-Serratos H. Costameres mediate force transduction in healthy skeletal muscle and are altered in muscular dystrophies. *J Muscle Res Cell Motil.* 25 (8):590-592 (2004)
- Boal D. *Mechanics of the cell.* Cambridge, University Press. Cambridge. 5a edición. (2006)
- Bobet J, Mooney RF, Gordon T. Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles. *Muscle Nerve.* 21(4): 536-539 (1998)
- Boschietti G. *Que es la electroestimulación.* Paidotribo Editorial. 2ª edición. (2002)
- Bozyczko D, Decker C, Muschler J, Horwitz A. Integrin on developing and adult skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 183:72-91. (1989)
- Bull H. *An Introduction to Physical Biochemistry.* Davis Co. Philadelphia. 1a edición. (1964)
- Campbell K, [Stull](#) J. Skeletal Muscle Basement Membrane-Sarcolemma-Cytoskeleton Interaction Minireview Series. *J. Biol. Chem.* 278, 12599-12600. (2003)
- Capetanaki Y, Milner DJ. Intermediate filaments. *Subcellular Biochem.* 31: 463-495. (1998)
- Capetanaki Y, Bloch R, Kouloumentaa A, Mavroidisa M, Stelios Psarrasa. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp. Res.* 31 3: 2063 – 2076. (2007)
- Claffin D, Brooks S. Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294:C651-C658. (2008)
- Craig S, Pardo J. Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril to sarcolemma attachment sites. *Cell Motil.* 3 (5-6):449-462. (1983)
- Crosbie RH, [Heighway J](#), [Venzke DP](#), [Lee JC](#), [Campbell KP](#). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* 12;272(50):31221-4. (1997)

- da Silva Lopez K, Pietas A, Radke M, Gotthardt M. Titin visualization in real time reveals an unexpected level of mobility within and between sarcomeres. *J. Cell Biol.* (2011)
- Dmytrenko G, Pumplin D, Bloch R. Dystrophin in Membrane Skeletal Network: Localization and Comparison to other Proteins. *J. Neurosc.* 13(2):547-558. (1993)
- Dulhunty, AF, Franzini-Armstrong C. The relative contribution of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibers at different sarcomere length. *J. Physiol.* 250:513-539. (1975)
- Dull RW. *Mathematics for Engineers.* New York:McGraw-Hill Book Company. New York , 2^a edición. (1941)
- Dvorkin M, Cardinali D, Lermoli R. *Best y Taylor Bases Fisiológicas de la práctica médica.* Editorial Médica Panamericana 13^a edición. (2010)
- Engel A, Frnazini-Armstrong C. *Myology: Basic and clinical. Vol.1* McGraw Hill, New York. 2a edición. (1994)
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl S, Gaver M, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic mice. *Nature.* 345(6273): 315-319 (1990)
- Ervasti J, Campbell K. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122:809-823 (1993)
- Ervasti J, Campbell K A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122:809-823 (1993)
- Ervasti JM. Costameres: The Achille's Heel of Herculean Muscle. *J. Biol. Chem.* 278, 13591-13594. (2003)
- Ervasti J. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochem Biophys. Acta* 1772 (2):108-117. (2007)
- Evans E, Yeung A. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipette aspiration. *Biophys. J.* 56:151-160. (1989)
- Fitzimons R. Fascioscapulohumeral muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 12:501-511 (1999)
- Fonbrune P. *Technique de Micromanipulation.* Massonn et Cie, Paris. (1949)
- Franzini-Amstrong, C. Fine structure of sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in muscle fibers. *Fed Proceed.* 23:887. (1964)
- Franzini-Amstrong C, Huser J, Reese T, Somlyo A, Somlyo AV. T-tubule swelling in hypertonic solutions:a freeze substitution study. *J Physiol-* 283:133-40 (1978)
- Garcia-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, Gonzalez-Serratos H. Passive viscoelastic properties of costameres in EDL muscle in normal and dystrophin null mice. *AIP Conf. Proc.* 1032:268-271. (2008)

Goldspink G, Fernandes K, Williams PE, Wells D. Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. *Neuromusc. Disord.* 4(3):183-191. (1994)

Granger B, Lazarides E. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell.* 18(4):1053-1063 (1979)

Grange RW, Gainer TG, Marschner KM, Talmadge RJ, Stull JT. Fast-twitch skeletal muscles of dystrophic mousepups are resistant to injury from acute mechanical stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283:C1090-C1101. (2002)

Henneman E, Claman HP, Gillies JD, Skinner R. Rank order of motoneurons within a pool: law of combination. *J Neurophysiol.* 37, 1338-1349. (1974)

Heydemann A, McNally E. Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycn complex in cardiac and skeletal myopathy. *Trends Card. Med.* 17(2):55-59. (2007)

Hochmuth R. Micropipette aspiration of living cells. *J. Biomech.* 33(1):15-22. (2000)

Hoffman E, Brown R, Kunkel L. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus: *Cell* 51: 919-928. (1987)

Hutter OF, Burton FL, Bovell DL. Mechanical properties of normal and mdx mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 12:585-589. (1991)

Huxley H. Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur. J. Biochem.* 271: 1403-1415. (2004)

Huxley AF, Niedergerke R. Measurement of muscle striations in stretch and contraction. *J. Physiol.* 124(2): 46-7P. (1954)

Huxley H, Hanson J. Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 173(4412):973-976. (1954)

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 3, 69(1):11-25. (1992)

Hoffman EP, Brown R, Kunkel L. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51:919-928. (1987)

Kreplak L, Herrmann H, Aebi U. Tensile Properties of Single Desmin Intermediate Filaments. *Biophys. J.* 94:2790-2799. (2008)

Lapidos K, Kakkar R, McNally M. The Distrophyn Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circ. Res.* 94:1023-1031. (2004)

Law D, Lightner VA. Divalent cation-dependent adhesion at the myotendinous junction: ultrastructure and mechanics of failure. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14:173-185. (1993)

Leckie F, Dal Bello D. *Strength and Stiffness of Engineering systems.* Springer. 1a edición. (2009)

- Li Z, Mericksay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornel L, Babinet C, Paulin D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 139 (1):129-144. (1997)
- Lovering RM, De Deyne PG. Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286: C230-C238. (2004)
- Lovering R, Porter N, Bloch R. *The Muscular Dystrophies: From Genes to Therapies.* Phys. Therapy. 85, 12 :1373-1385. (2005)
- Macintosh R, Gardiner F, McComas J. *Skeletal Muscle: Form and Function.* Human Kinetics Publishers. 2a edición. (2005)
- Matsumura K, Campbell K. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 17:2–15. (1994)
- Mayer U. Integrins: Redundant or Important Players in Skeletal Muscle?. *J. Biol. Chem.* 278(17) 14587-14590. (2003)
- Mitchison JM. The thickness of the sea urchin fertilization membrane. *Exp. Cell. Res.* 5 (2):536-538. (1953)
- Monti RJ, Roy R, Edgerton V. Role of motor unit structure in defining function. *Muscle Nerve,* 24:848-866. (2001)
- Na S, Chowdhury F, Tay B, OuyangM, Gregor M, Wang Y, Wiche G, Wang N. Plectin contributes to mechanical properties of living cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296 (4):C868-C877. (2009)
- Needham D and Hochmuth M. A sensitive measure of surface stress in the resting neutrophil. *Biophys. J.* 61 (6):1664-1670. (1992)
- Nigro V, Piluso G, Belsito A, Politano L, et al. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 5(8):1179–1186. (1996)
- Nowak K, Davis K. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *European Mol. Biol. Org.* 5:872-876. (2004)
- Oak SA, Zhou Y, Jarrett W. Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J. Biol. Chem.* 278 (41):39287-39295. (2003)
- Ohlendieck K, Ervasti J, Snook J, Campbell K. Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J Cell Biol* 112:135-148. (1991)
- O'Neill A, Williams M W, Resneck W, Milner D, Capetanaki Y, Bloch R. Sarcolemmal organization in skeletal muscle lacking desmin: evidence for cytokeratins associated with membrane skeleton at costameres. *Mol. Biol. Cell* 13:2347-2359. (2002)
- Ozawa E. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: Evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21:421-438. (1998)

- Pardo J, Siliciano J, Craig S. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: Transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 80:1008-1012. (1983)
- Pasternak C, Wong S, Elson E. Mechanical Function of Dystrophin in Muscle Cells. *J. Cell Biol.* 128 (3):355-361. (1995)
- Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research* 301:1-7. (2004)
- Pellicer J, García-Morales V, Hernández M. On the demonstration of the Young-Laplace equation in introductory physics courses. *Teaching Phys.* 35 (2):126-129. (2000)
- Petrof B, Shrager J, Stedman H, Kelly A, Sweeney L. Dystrophin protect the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3710-3714. (1993)
- Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ. Dystrophin colocalizes with β -spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 117:997-1005. (1992)
- Proske U y Morgan L. Stiffness of cat soleus muscle and tendon during activation of part of muscle. *J. Neurophysiol.* 52:459-468. (1984)
- Quach NL, Rando TA. Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *Dev. Biol.* 293:38-52. (2006)
- Rand RP. Mechanical properties of the Red Cell Membrane. *Biophys. J.* 4:303-316. (1964)
- Rapoport S. Mechanical Properties of the Sarcolemma and Myoplasm in Frog Muscle as a Function of Sarcomere Length. *J. Gen. Physiol.* 59:559-585. (1972)
- Reed P, Mathews K, Mills K, Bloch R. The Sarcolemma in the Large myd mouse. *Muscle and Nerve* 30:585-595. (2004)
- Reed P, Bloch RJ. Postnatal changes in sarcolemmal organization in mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* 15(8):552-561. (2005)
- Resnick R, Halliday D, Krane K. *Fisica*, Mexico: Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., 4a edición. (1997)
- Rybakova I, Patel J, Ervasti J. The dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link Between the Sarcolemma and Costameric Actin. *J. Cell Biol.* 150 (5):1209-1214. (2000)
- Sam M, Shah S, Friden J, Milner D, Capetanaki Y, Lieber R. Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279:C1116-C1122. (2000)
- Sanes J. Laminin, Fibronectin and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J Cell Biol.* 93:442-451. (1982)
- Sgambato A, Brankaccio A. The Dystroglycan Complex: From Biology to Cancer. *J. Cell Physiol.* 205:163-169. (2005)

Shah SB, Peters D, Jordan K, Milner D, Fridén J, Capetanaki Y, Lieber R. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 204:1703-1710. (2001)

Shah S, Davis J, Weisleder N, Kostavassili I, McCulloch A, Raltson E, Capetanaki Y, Lieber R. Structural and Functional Roles of Desmin in mouse Skeletal Muscle during Passive Deformation. *Biophys. J.* 86:2993-3008. (2004)

Shear CR, Bloch RJ. Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: Localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J. Cell. Biol.* 101:240-256. (1985)

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook A, Barnard E, Darlison M, Barnard P. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 244 (4912):1578-1580. (1989)

Spence HJ, Chen Y, Winder J. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion: *Bioessays.* 24: 542-552. (2002)

Srivastava A, Jain C. *Chemistry Vol. 2.* Goyal Offset. 2a edición. (2006)

Straub V, Rafael JA, Ghamberlain JS, Gampbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *Cell Biol.* 139:375-385. (1997)

Stone MR, O'Neill A, Lovering R, Strong J, Resneck WG, Reed PW, Toivola D, Ursitti J, Omary BM, Bloch RJ. Absence of keratin 19 in mice causes skeletal myopathy with mitochondrial and sarcolemmal reorganization. *J. Cell Sci.* 120(22):3999-4008. (2007)

Street S. Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters. *J. Cell Physiol.* 114:346-364. (1983)

Taylor R. *Classical mechanics.* University Science Books, Sausalito. 2a edición. (2005)

Thoumine O, Cardoso O, Meister JJ. Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading: a micromanipulation study. *Eur. Biophys. J.* 28(3):222-234. (1999)

Trans-Son-Tay R, Needham D, Yeung A, Hochmuth M. Time dependant recovery of passive neutrophils after large deformation. *Biophys. J* 60(4):856-866. (1991)

Ursitti J, Lee P, Resneck W, McNally M, Bowman A, O'Neill A, Stone M, Bloch R. Cloning and characterization of cytokeratins 8 and 19 in adult rat striated muscle. Interaction with the dystrophin glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 279(40):41830-41838. (2004)

Waugh E, Evans E. Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophys. J.* 26:115-132. (1979)

Wieneke S, Stehle R, Li Z, Jockusch H. Generation of Tension by Skinned Fibers and Intact Skeletal Muscles from Desmin-Deficient Mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 278:419-425. (2000)

Williams W, Bloch R. Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20:383-393. (1999)

Wolff A, Niday A, Voelker K, Call J, Evans N, Granata K, Grange W. Passive mechanical properties of maturing extensor digitorum longus are not affected by lack of dystrophin. *Muscle Nerve* 34 (3):304-312. (2006)

Zhang Q, Wang X, Wei X, Chen W. Characterization of viscoelastic properties of normal and osteoarthritic chondrocytes in experimental rabbit model. *Osteoarthritis and cartilage* 16(7):837-840. (2007)

Zubrzycka-Gaarn EE, Hutter O, Karpati G, Klamut HJ, Bulman D, Hodges R, Worton R, Ray P. Dystrophin is tightly associated with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibres. *Exp. Cell Res.* 192:278-288. (1991)

Anexo I

Conceptos Físicos

De las propiedades mecánicas que habitualmente se estudian en la célula son la rigidez, la tensión y la presión que pueden tolerar. En este capítulo se hace una breve descripción de algunas propiedades físicas que son de interés en el ámbito biológico.

A.1.1 Presión y Fuerza

La presión es una **magnitud física** que establece que la fuerza por unidad de superficie y sirve para caracterizar la forma en la que se aplica una determinada fuerza resultante sobre una superficie. En el **Sistema Internacional de Unidades** (SI) la presión se mide en una unidad derivada que se denomina **pascal** (Pa) que es equivalente a la fuerza total de un **newton** actuando uniformemente en un **metro cuadrado**.

La presión relaciona la fuerza con la superficie sobre la que actúa. Cuando sobre una superficie plana de **área** A se aplica una **fuerza normal** F de manera uniforme y perpendicular a la superficie (Figura A.1), la presión P viene dada por:

$$P = \frac{F}{A} \quad (\text{N/m}^2) \quad 1.1$$

En un caso general donde la fuerza puede tener cualquier dirección y no estar distribuida uniformemente en cada punto la presión se define como:

$$P = \frac{\vec{F}}{A \cdot \vec{n}} \quad (\text{N/m}^2) \quad 1.2$$

Donde \vec{n} es un vector unitario y normal a la superficie en el punto donde se pretende medir la presión.

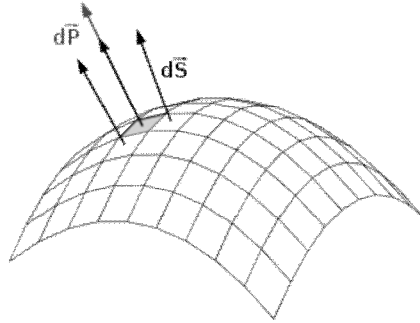


Figura A.1 Esquema que representa cada elemento con una fuerza $d\mathbf{P}$ y un área $d\mathbf{S}$, donde $d\mathbf{P}$ es la diferencial de presión y $d\mathbf{S}$ la diferencial de superficie.

Si despejamos la fuerza (\mathbf{F}) de la Ecuación 1.2 obtenemos:

$$\mathbf{F} = \mathbf{P}\mathbf{A} \text{ (dina)} \quad 1.3$$

Donde \mathbf{P} es la presión aplicada sobre el elemento de área \mathbf{A} . En concreto va a ser la generada por el domo, donde $\mathbf{A} = 2\pi r\mathbf{h}$ siendo \mathbf{r} el radio de curvatura y \mathbf{h} la altura del domo.

A.1.2 La presión hidrostática

Es la presión que sufren los cuerpos sumergidos en un líquido o fluido por el simple hecho de estar sumergidos en éste. Si hacemos un diagrama de fuerzas, las fuerzas verticales son debidas tanto a la presión del fluido como al peso del elemento (Resnick et. al., 1997). Entonces,

$$\frac{dp}{dy} = -\rho g \quad 1.4$$

Esta ecuación nos dice como varía la presión con la elevación sobre cierto nivel de referencia en un fluido en equilibrio estático. Al disminuir la elevación (dy negativa) la presión aumenta (dp positiva). La cantidad ρg se conoce como peso específico del fluido. Al integrar la ecuación 1.4 da

$$\mathbf{P} = - \int_{y^1}^{y^2} \rho g \, dy \quad 1.5$$

En los líquidos, que son casi incompresibles, ρ es constante por lo que al resolver la Ec. 1.5 obtenemos:

$$\mathbf{P} = -\rho g (y_2 - y_1) \quad 1.6$$

Pero $y_2 - y_1$ es la altura o profundidad \mathbf{h} a la cual la presión es \mathbf{P} , de modo que:

$$\mathbf{P} = -\rho g \mathbf{h} \quad 1.7$$

Donde ρ es la densidad del fluido, g es la constante gravitacional y \mathbf{h} es la diferencia de alturas en el manómetro, para nuestro caso. Con esta ecuación podremos calcular la presión que está siendo aplicada al sistema.

A.1.3 Tensión

La γ sostenida por la membrana, se obtuvo usando la ecuación de Young-Laplace (Boal, 2006),

$$\mathbf{P} = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \left(\frac{\text{dina}}{\text{cm}^2} \right) \quad 1.8$$

Donde r_1 y r_2 son los radios de curvatura de una membrana circular doblada simétricamente con dos radios de curvatura, r_1 y r_2 . \mathbf{P} es el gradiente de presión a lo largo de la membrana. Como el domo es parte de una esfera simétrica, los centros de curvatura \mathbf{C} , son los mismos, es decir $\mathbf{C}_{n=1,2}$ $\mathbf{C}_1 = \mathbf{C}_2 = \mathbf{C}$, entonces los radios $r_1 = r_2 = r$, quedando un solo radio r (Rand, 1964; Pellicer et. al., 2000) (Figura A.2).

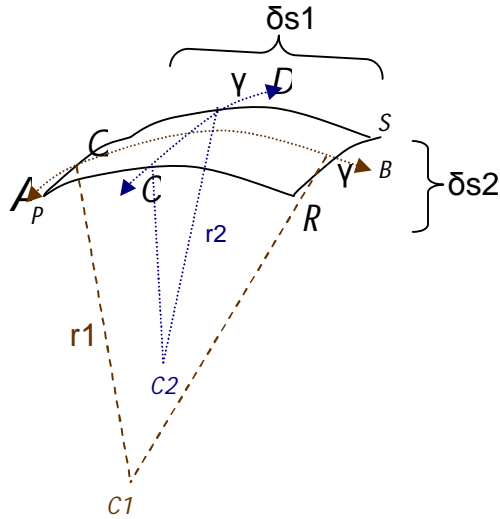


Figura A.2 Gradiente de presión P a lo largo de la membrana que esta siendo deformada en el eje x y y .

De ésta forma,

$$P = \frac{2\gamma}{r} \left(\frac{\text{dina}}{\text{cm}^2} \right) \quad 1.9$$

El radio de curvatura se obtiene a través de la relación existente entre la mitad del diámetro de la pipeta ($c/2$) y la diferencia entre la altura del domo (h) y el radio (r), lo anterior viene relacionado por el Teorema de Pitágoras. Así que al sustituir nuestras variables y despejar r , obtenemos la relación $r = c^2/8h + h/2$ (cm) (Figura A.3),

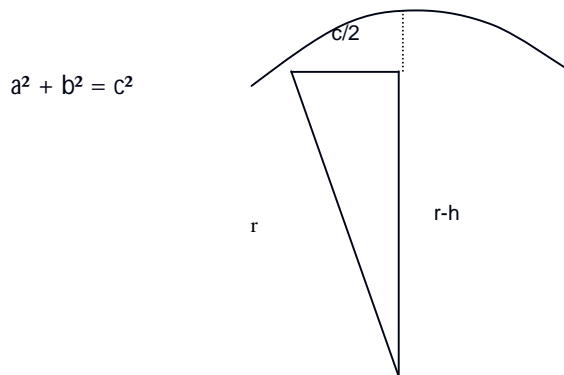


Figura A.3 Representación del radio de curvatura en una membrana semiesférica

Si sustituimos r , en la ecuación de Young-Laplace obtenemos:

$$P = \frac{\gamma}{r} = \left(\frac{\gamma}{\frac{d^2}{8h} + \frac{h}{2}} \right) \left(\frac{\text{dina}}{\text{cm}^2} \right) \quad 1.10$$

A.1.4 Rigidez

Si se estira o se comprime un resorte, la fuerza que el resorte desarrolla depende de la cantidad del alargamiento o de la compresión x , y se conoce como la ley de Hooke (ecuación 1.11).

$$F = -kx \quad (\text{dina}) \quad 1.11$$

Donde el signo negativo de la ecuación indica que la dirección de la fuerza que el resorte ejerce es opuesta la dirección del desplazamiento y k es la pendiente de la línea que relaciona la fuerza F con el grado de estiramiento x , que es constante, k también es llamada como resistencia o rigidez del resorte. Si la k es superada por la fuerza externa, entonces el material queda deformado permanentemente. El cedimiento es lo recíproco a rigidez por lo que un material que es elástico tiene rigidez y uno plástico cede fácilmente

Anexo II
Índice de figuras y tablas

Figura	Descripción	Página
1.1	Representación esquemática e histológica de los tipos de músculo	11
1.2	Sección transversal del músculo esquelético	15
1.3	Esquema de una célula muscular esquelética	16
1.4	Estructura y disposición de la actina y miosina	18
1.5	Localización de las costameras	20
1.6	Microfotografía de la triada	29
1.7	Acople excitación – contracción	32
1.8	Cambios en la longitud del sarcómero	33
1.9	Relación longitud-tensión en el músculo esquelético	34
1.10	Ciclo de los puentes cruzados	35
1.11	Formación de ondulaciones durante la contracción	38
1.12	Imágenes de microscopía confocal de células tipo <i>WT</i> , <i>mdx</i> y <i>des-/-</i>	41
4.1	Obtención de la célula muscular esquelética	45
4.2	Cámara experimental en la platina del microscopio óptico	46
4.3	Plato circular y cámara experimental	47
4.4	Diseño experimental	49
4.5	Generación del domo	53
5.1	Formación del domo en una célula muscular <i>WT</i>	56
5.2	Curva P-h para una célula muscular <i>WT</i>	58
5.3	Efecto de la LS en la P _{sep} en células musculares <i>WT</i>	60
5.4	Histogramas del efecto de la LS en relación a la P _{sep}	61
5.5	Rompimiento del domo sarcolemal en una célula <i>WT</i>	62
5.6	Histogramas de la P _{romp} del sarcolema <i>WT</i>	62
5.7	Histogramas de la γ_{total} , γ_{sarcol} y γ_{cost} en <i>WT</i>	64
5.8	Histogramas de k _{total} y k _{sarcol} en <i>WT</i>	65
5.9	Formación del domo en una célula muscular <i>mdx</i>	68
5.10	Curva P-h para una célula muscular <i>mdx</i>	69
5.11	Efecto de la LS en la P _{sep} en células musculares <i>mdx</i>	71
5.12	Rompimiento del domo sarcolemal en una célula <i>mdx</i>	72
5.13	Formación del domo en una célula muscular <i>des-/-</i>	74
5.14	Curva P-h para una célula muscular <i>des-/-</i>	75
5.15	Efecto de la LS en la P _{sep} en células musculares <i>des-/-</i>	77

5.16	Rompimiento del domo sarcolemal en una célula <i>des-/-</i>	77
5.17	Curvas P-h para los 3 tipos de células	79
5.18	Efecto de la LS en la Psep los 3 tipos de células	80
5.19	Histograma de la Promp en los 3 tipos de células	81
5.20	Histogramas de la γ_{total} , γ_{sarcol} y γ_{cost} en los 3 tipos de células	83
5.21	Histogramas de k_{total} y k_{sarcol} en los 3 tipos de células	85
6.1	Modelo distribuido de resortes	87
6.2	Valores k_{total} experimentales y normalizados	88
6.3	Pasos para resolver el modelo elástico distribuido	89

Tabla	Descripción	Página
1.1	Generalidades de los músculos	12
1.2	Clasificación de las fibras del músculo esquelético	13
1.3	Miopatías humanas asociadas a proteínas sarcolemales	40
5.1	Valores de P_{sep} , P_{romp} , k_{tot} , k_{sarcol} , γ_{tot} , γ_{sarcol} , γ_{cost} para <i>WT</i>	66
5.2	Valores de P_{sep} , P_{romp} , k_{tot} , k_{sarcol} , γ_{tot} , γ_{sarcol} , γ_{cost} para los 3 tipos de células	85
6.1	Valores de k obtenidos en la iteración	90
6.2	Comparación entre k_{total} y $k_{eqtotal}$	90

Anexo III

Currículo Vitae

- Educación** 1998-2004 Física
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM
Tesis: "Eficiencia a la respuesta de dosímetros TLD-100 expuestos a rayos X usados en diagnóstico clínico"
Directora de tesis: Dra. Maria Ester Brandan Siqués
1994-1997 Preparatoria
Colegio Williams, Mexico D.F.
- Publicaciones** **Karla García-Pelagio**, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo González-Serratos. (2011) Biomechanics of the sarcolemma and costameres in single skeletal myofibers from normal and dystrophin- null mice. *J Muscle Res Cell Motil.* 31(5-6):323-36.
Karla García-Pelagio, Iván Santamaría-Holek, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo González-Serratos. (2010) Passive viscoelastic properties of costameres in EDL muscle in normal and dystrophin null mice AIP Conf. Proc. 1310:68-72
Karla García-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo González-Serratos. (2008) Passive viscoelastic properties of costameres in EDL muscle in normal and dystrophin null mice AIP Conf. Proc. 1032:268-271
García-Pelagio K., Bloch R, Ortega A., González-Serratos H(2006) Elastic Properties of the Sarcolemma-Costamere Complex of Muscle Cells in Normal Mice AIP Conf. Proc., USA 854:51-53
- Presentaciones Orales**
Nacionales e Internacionales **Karla Garcia-Pelagio**, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo Gonzalez-Serratos. (2010). Physics2Life Workshop. The 33rd Katzir Center Conference. Instituto Weizmann de Ciencias. Rehovot, Israel
Karla García-Pelagio, Robert Bloch, A. Ortega, Hugo González-Serratos. (2010) PASI: Function and regulation of the cytoskeleton. V Internacional Symposium on Myosin V. Rio de Janeiro, Brasil.
Karla García-Pelagio, Ivan Santamaría, Robert Bloch, A. Ortega, Hugo González-Serratos. (2010). X Mexican Symposium on Medical Physics. Ciudad de México, Mexico
Karla Garcia-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo Gonzalez-Serratos (2009) LII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Morelia, Michoacán, México
García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, González-Serratos H (2009) XIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de México, UAM
García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, González-Serratos H (2008) LI Congreso de Ciencias Fisiológicas, Mérida, Yucatán, México
Karla Garcia-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo Gonzalez-Serratos (2007) L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla, México
García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, Gonzalez-Serratos H (2007) 1er Congreso de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM, México
Karla García-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo Gonzalez-Serratos, (2006) IX Mexican Symposium on Medical Physics. Guadalajara, Jalisco, Mexico
- Cartel**
Karla García-Pelagio, Robert Bloch, A. Ortega, H. González-Serratos. (2010) 54th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Francisco, CA, USA
Karla García-Pelagio, Robert Bloch, Hugo González-Serratos. (2010) LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Villa Hermosa, Tabasco, México

Karla García-Pelagio, Robert Bloch, A. Ortega, H. González-Serratos (2009) VII Iberoamerican Congress of Biophysics. Buzios, Brasil

Karla García-Pelagio, Ivan Santamaría, Robert Bloch, A. Ortega, H. González-Serratos.(2009) 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society, Boston, Ma, USA

Bianca Do Santos, Ruzhang Zhang, **Karla García-Pelagio**, H. González-Serratos. (2009) FASEB Experimental Biology Meeting

García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, González-Serratos H (2009) 2o Concurso Nacional de Ciencias Básicas y Creatividad, Guanajuato, México

Karla García-Pelagio, R. Bloch, A. Ortega, H. González-Serratos (2008) LI Congreso Nacional de Física Zacatecas, Mexico

K García-Pelagio, R. Bloch, A. Ortega, H. González-Serratos. (2008) 52nd Biophysical Society Annual Meeting. Long Beach, California, USA

Santos Bianca, R. Zhang, **K. García-Pelagio**, H. Gonzales-Serratos (2008). 52nd Biophysical Society Annual Meeting, Long Beach, California, USA

García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, González-Serratos H (2008) 1er Concurso Nacional de Ciencias Básicas y Creatividad, Guanajuato, México

Karla García-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo González-Serratos. (2008). X Mexican Symposium on Medical Physics. Mexico City, Mexico

Karla García-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo Gonzalez-Serratos (2007) 51st Biophysical Society Annual Meeting. Baltimore, Maryland, EUA

García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, González-Serratos H (2007) X Ibero-American Congress on Cell Biology Mexico City, Mexico

Karla Garcia-Pelagio, Robert Bloch, Alicia Ortega, Hugo Gonzalez-Serratos (2007). Joint Meeting of the SW-AAPM and FMOFM an International Medical Physics Conference, Querétaro, México

Karla Garcia-Pelagio, Hugo Gonzalez-Serratos, Robert Bloch (2006) 50th Biophysical Society Annual Meeting. Salt Lake City, Utah, USA

García-Pelagio K., Bloch J R and Gonzales-Serratos Hugo (2005) Interdisciplinary Training Program in Muscle Biology Eleventh Annual Mini-Retreat Baltimore, Maryland U.S.A. Faculty and Trainee Posters

García-Pelagio K, Bloch R and Gonzalez-Serratos H (2005) 10th Annual Retreat Training Program in Integrative Membrane Biology, University of Maryland, Baltimore, USA

García-Pelagio KP, Bloch RJ and Gonzalez-Serratos H (2004) Ninth Annual Retreat Training Program in Integrative Membrane Biology, University of Maryland, Baltimore

K.García-Pelagio, C. Ruiz, ME Brandan (2003) XLVI Congreso Nacional de Física, Yucatan, Mexico

Distinciones

Travel Award para asistir a Physics2life Workshop (2010) en el Instituto Weizmann de Ciencias en Rehovot, Israel

Financiamiento por parte de PASI (Pan American Studies Institute) para asistir al curso de entrenamiento Function and Regulation of the Cytoskeleton (2010) en la Universidad Federal do Rio de Janeiro, Brasil

International Travel Award of Biophysical Society (2009) en Boston, Ma, USA

Travel Award para asistir al VII Iberoamerican Congress of Biophysics (2009) Buzios,Brasil

Mención Honorífica en el Membrane Subgroup of the Biophysical Society (2008) en Long Beach California, USA

International Travel Award of Biophysical Society (2007) en Baltimore, MD, USA

2o lugar en el Primer Congreso de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM (2007), UNAM, México

Beca para asistir al XI Escuela de Verano en Física (2003) Mexico

Estancias de investigación

En el Laboratorio del Dr. Hugo González-Serratos[†] y del Dr. Robert J. Bloch del departamento de Fisiología de la escuela de Medicina en la Universidad de Maryland, E.U. 2004-2005

Biomechanics of the sarcolemma and costameres in single skeletal muscle fibers from normal and dystrophin-null mice

K. P. García-Pelagio · R. J. Bloch · A. Ortega ·
 H. González-Serratos

Received: 26 November 2010 / Accepted: 11 January 2011 / Published online: 11 February 2011
 © Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract We studied the biomechanical properties of the sarcolemma and its links through costameres to the contractile apparatus in single mammalian myofibers of *Extensor digitorum longus* muscles isolated from wild (WT) and dystrophin-null (mdx) mice. Suction pressures (P) applied through a pipette to the sarcolemma generated a bleb, the height of which increased with increasing P. Larger increases in P broke the connections between the sarcolemma and myofibrils and eventually caused the sarcolemma to burst. We used the values of P at which these changes occurred to estimate the tensions and stiffness of the system and its individual elements. Tensions of the whole system and the sarcolemma, as well as the maximal tension sustained by the costameres, were all significantly lower (1.8–3.3 fold) in muscles of mdx mice compared to WT. Values of P at which separation and bursting occurred, as well as the stiffness of the whole system and of the isolated sarcolemma, were ~2-fold lower in mdx than in WT. Our results indicate that the absence of dystrophin reduces muscle stiffness, increases sarcolemmal deformability, and compromises the mechanical stability of costameres and their connections to nearby myofibrils.

Keywords Muscle mechanics · Costamere · mdx · Superficial tension · Dystrophic muscle · Muscular dystrophy

Introduction

Costameres are structures at the sarcolemma of striated muscle fibers that align circumferentially with the Z disks and the M bands of the nearest myofibrils. Costameres maintain and coordinate the organization of the sarcolemma with the underlying contractile apparatus, while ensuring that distortions in the sarcolemma during isotonic contractions, that lead to shortening below the equilibrium length, are small and periodic (Bloch et al. 2002; Bloch and Gonzalez-Serratos 2003; Anastasi et al. 2008). They also organize membrane domains at the sarcolemma that are enriched in proteins, signaling molecules, ion channels and pumps, that are essential for proper physiological function of striated muscles (Brenman et al. 1995; Williams and Bloch 1999a; Oak et al. 2003; Ervasti 2003). They constitute an essential structure in the pathway for lateral force transmission from myofibrils through the sarcolemma to the extracellular matrix, and ultimately to the tendons (Bloch and Gonzalez-Serratos 2003). Defects in proteins at costameres can compromise muscle force production during contraction either directly, by reducing the efficiency of lateral force transmission, or indirectly, by increasing the chances that the sarcolemma will be weakened and damaged, resulting in degeneration or death of the myofiber (Reed and Bloch 2005; Blaauw et al. 2008). Many muscular dystrophies, associated with a profound weakness and fragility of myofibers (Barton 2006), have been linked to alterations in costameric proteins such as dystrophin (Hoffman et al. 1987; Williams and Bloch 1999b;

K. P. García-Pelagio · A. Ortega
 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
 Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico,
 DF 04510, Mexico

R. J. Bloch · H. González-Serratos
 Department of Physiology, University of Maryland, School
 of Medicine, 655 West Baltimore St., Baltimore,
 MD 21201, USA

H. González-Serratos (✉)
 Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad
 Nacional Autónoma de México, Mexico, DF 04510, Mexico
 e-mail: hgonzale@umaryland.edu

Rybakova et al. 2000; Ervasti 2007), sarcoglycans (Nigro et al. 1996; Williams and Bloch 1999a; Lapidus et al. 2004), and dystroglycans (Ozawa 1998; Campbell and Stull 2003; Ayalon et al. 2008).

Dystrophin is a 427 kDa cytoskeletal protein enriched at costameres that is thought to connect the cytoskeleton to integral proteins of the plasma membrane (Porter et al. 1992; Ervasti and Campbell 1991, 1993; Williams and Bloch 1999a; Rybakova et al. 2000; Ursitti et al. 2004; Bhosle et al. 2006; Ervasti 2007; Stone et al. 2007), and through the membrane, to the basal lamina (Ohlendieck et al. 1991; Dmytrenko et al. 1993; Winder 1997; Campbell and Stull 2003; Beedle et al. 2007). Dystrophin and the proteins with which it associates at the plasma membrane, termed the dystrophin–glycoprotein complex, have been linked to different forms of muscular dystrophy. In particular, Duchenne and Becker muscular dystrophies are caused by mutations in the gene that encodes dystrophin, leading to its absence (Duchenne) or presence at the sarcolemma in reduced amounts or with impaired activity (Becker). Despite extensive study, the function of dystrophin and its biomechanical role at the sarcolemma, as well as how defects in the protein lead to muscular dystrophy, are still poorly understood (Nowak and Davies 2004; Claffin and Brooks 2008). Studies of the dystrophin-null mouse (*mdx*) model have shown that skeletal myofibers have disorganized costameres, which resemble those seen in biopsies of human muscular dystrophies (Porter et al. 1992; Ehmer et al. 1997; Minetti et al. 1998; Williams and Bloch 1999a; Reed and Bloch 2005). The location and structure of dystrophin suggest that it may play a role in the stability, stiffness and organization of the sarcolemma. Consistent with this, dystrophin mechanically reinforces the sarcolemma, protecting it from the membrane stresses developed during muscle contraction (Zubrzycka-Gaarn et al. 1988; Petrof et al. 1993; Blaauw et al. 2010.) Furthermore, some authors (Zubrzycka-Gaarn et al. 1988; Rybakova et al. 2000; Hutter et al. 1991) have shown that dystrophin is tightly attached to the sarcolemma and that it remains attached to the sarcolemma when the latter is separated from the myofibrils. The absence of dystrophin in myotubes prepared from the *mdx* mouse has also been linked to a substantial reduction in cell stiffness (Pasternak et al. 1995).

Here we address the possibility that the absence of dystrophin results in a decrease in the transmission of passive force laterally, from the myofibrils to the sarcolemma, linked to changes in the properties of costameres. We use aspiration with a large bore micropipette to examine the biomechanical properties of the sarcolemma and costameres of wild type muscle fibers and *mdx*. This method has been used to measure the surface tension (Mitchison 1953), and the mechanical properties of cell

membranes (Rand 1964; Evans and Yeung 1989; Hochmuth 2000; Zhang et al. 2007) including the sarcolemma of frog muscle fibers (Rapoport 1972). We examine the biomechanical properties of murine myofibers with the aim of determining the tension, stiffness and breaking point of the attachments between the sarcolemma and nearby myofibrils, which are likely to occur at costameres, and how these properties are affected by the absence of dystrophin. We report that the links between the contractile apparatus and costameres at the sarcolemma are stronger and stiffer in wild type than in *mdx* myofibers, and further, that the ability of the isolated sarcolemma to resist bursting is weakened in *mdx* mice. Preliminary accounts of these results have been published elsewhere (Garcia-Pelagó et al. 2006, 2008).

Materials and methods

Animals

WT mice (C57Bl/10ScSn, $n = 30$) and *mdx* (C57-Bl/10ScSn-DMD-*mdx*, $n = 18$) mice, from 7 to 11 weeks of age, were used. *WT* mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME); *mdx* mice were raised in the Central Animal Facility of the University of Maryland, Baltimore. Before removal of muscles and dissection of myofibers, mice were euthanized by cervical dislocation without anesthesia. All experiments were in accordance with institutional guidelines for the care and welfare of laboratory animals.

Isolation of muscle fibers

Both EDL muscles were rapidly and carefully dissected under low magnification ($\times 3$), and placed in Krebs's solution, containing in mM: 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 15 NaHCO₃, 11 glucose, 1 Na₂HPO₄ and 2.5 CaCl₂, equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ to a pH of 7.0. Small bundles of approximately 100 fibers from the third toe muscle of the EDL muscle were isolated under a dissecting microscope. The bathing solution was replaced at least 3 times with Krebs's solution without Ca²⁺ and containing 15 mM EGTA. Bundles of fibers were transferred to relaxing solution, containing in mM: 185 K(C₂H₃COO), 2.5 Mg(CH₃COO)₂·4H₂O, 10 imidazole propionate, 2.5 Na₂ATP, 5 EGTA, pH 7.1. Single fibers were isolated from the bundles as previously described (Gonzalez-Serratos 1971). Dissecting in relaxing solution reduced the possibility of damaging myofibers. Similar preparations have been used to measure biomechanical properties in myofibers isolated from normal or mutant mice (Wieneke et al. 2000; Shah et al. 2004). The increase in myoplasmic Ca²⁺

concentration ($[Ca^{2+}]_i$) during exposure of myofibers to high K^+ concentrations, similar to the one we used here, is brief and transient, lasting only a few seconds, after which $[Ca^{2+}]_i$ decreases to normal values (Caputo and Bolaños 1994), so prolonged increases in $[Ca^{2+}]_i$ do not occur. Low $[Ca^{2+}]_o$ has no deleterious effect on the biomechanical properties of isolated myofibers (Wieneke et al. 2000). We confirmed the latter by monitoring the health of the myofibers throughout our experiments, as described below.

General procedure

Isolated fibers were transferred to an experimental chamber containing relaxing solution, fixed to a stage of a compound Laborlux microscope (E. Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The optical part of the microscope was placed on an XY stage so that every part of the muscle cell could be visualized without disturbing the preparation or the subsequent placement of the glass micropipette. One tendon was clamped against a cover slip at the bottom of the chamber; the other tendon was fixed to a Narishige M-2 micromanipulator (Labtron Scientific Products, Farmingdale, NY), used to stretch the fiber. Photomicrographs were taken with a digital camera (Nikon D70, NY) through a $\times 10$ eyepiece and $\times 40$, N.A. 0.75 water immersion objective. The fiber was stretched to the desired average sarcomere length (SL), measured first by eye and then with Image J software (NIH, Bethesda, MD). The former measurements were made with a calibrated micrometer positioned inside a $\times 25$ eyepiece. The diameter of the fiber was measured after SL was set. Experiments were done at $8^\circ C$, controlled by a GB32J36 thermistor (Fenwal Electronics, Framingham, MA), connected to a temperature controller (Yellow Springs Instrument Co., Inc, Ohio OH), which maintained the temperature through a two Peltier modulus (Midland Ross, Cambridge, MA). A micropipette (see below) was placed on the surface of the myofiber, and negative suction pressure (P) was applied.

Micropipettes

Micropipettes were made as described by Fonbrune (1949). Capillary tubes of 2 mm internal diameter were pulled to create a flat tip of internal opening of 0.50–0.66 times the diameter of the myofibers. In order to acquire precise measurements of the internal diameter of the micropipettes they were not fire polished because the curvature tip of these pipettes introduces microscopic distortions. The micropipettes do not damage the sarcolemma. The micropipette was connected to a set of manometers (see below) and was positioned on the surface of the myofiber with a micromanipulator (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL).

Elastimetry

We modified the method of Rapoport (1972). Micropipettes were attached to 2 manometers, one filled with Hg and the other with perfluorinated polyether liquid (Miller-Stephenson, CT), with densities $\rho = 13.5$ and $\rho = 1.71 \text{ g/cm}^3$, respectively (Fig. 1). The manometers were connected at one end to the micropipette and at the other to a syringe piston, and could be used independently. The manometers were first calibrated to zero suction pressure (P) by connecting the pipette to a 2 mm diameter capillary placed between the pipette and either one of the manometers. The capillary was filled with distilled water and graphite particles, and the tip of the micropipette was filled with bathing solution. The tips of the capillary were placed at the level of the myofibers. Graphite particles in the capillary were observed with a compound microscope. Changes in the height of the manometers produced an inflow or outflow of the solution inside the capillary, resulting in the movement of graphite particles. When the graphite particles did not move, the applied pressure was zero. The existence of good seals (no leakage) between the micropipettes and the myofiber's sarcolemma was explored by applying suction pressure, P , which produced a bleb (Fig. 2). A constant value for P at a given manometer setting indicated a good seal. If we

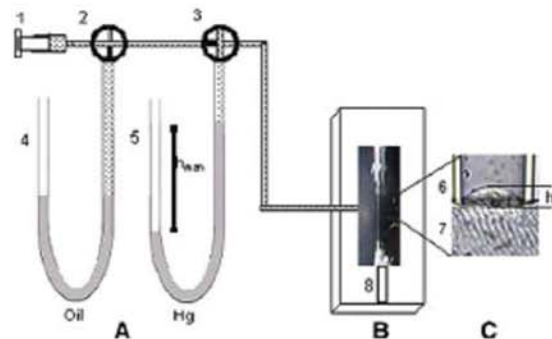


Fig. 1 Experimental arrangement. The experimental system consisted of (A) a set of manometers, (B) the optical system (not shown) with a compound microscope to observe the isolated fiber, and (C) the bleb formed by the applied negative pressure P to the myofiber. The syringe (1) was connected to manometers filled with perfluorinated polyether manometer (4) or with mercury (5), which were used independently. We used 4 way key valves (2 and 3) to set P inside the syringe with either of the manometers. Also shown are the micropipette (6) and the surface of the isolated myofiber (7), attached to the bottom of the experimental chamber with a clip (8). We induced a bleb of variable height h in the surface of the fiber by applying suction pressure. When key valve 3 was open to the syringe through valve 2 (shown as closed to manometer 4 in the drawing) the syringe, manometer and micropipette had the same negative P . By closing the branch between key valve 3 and the syringe (as shown in the figure), P inside the manometer and the micropipette were the same and remained constant

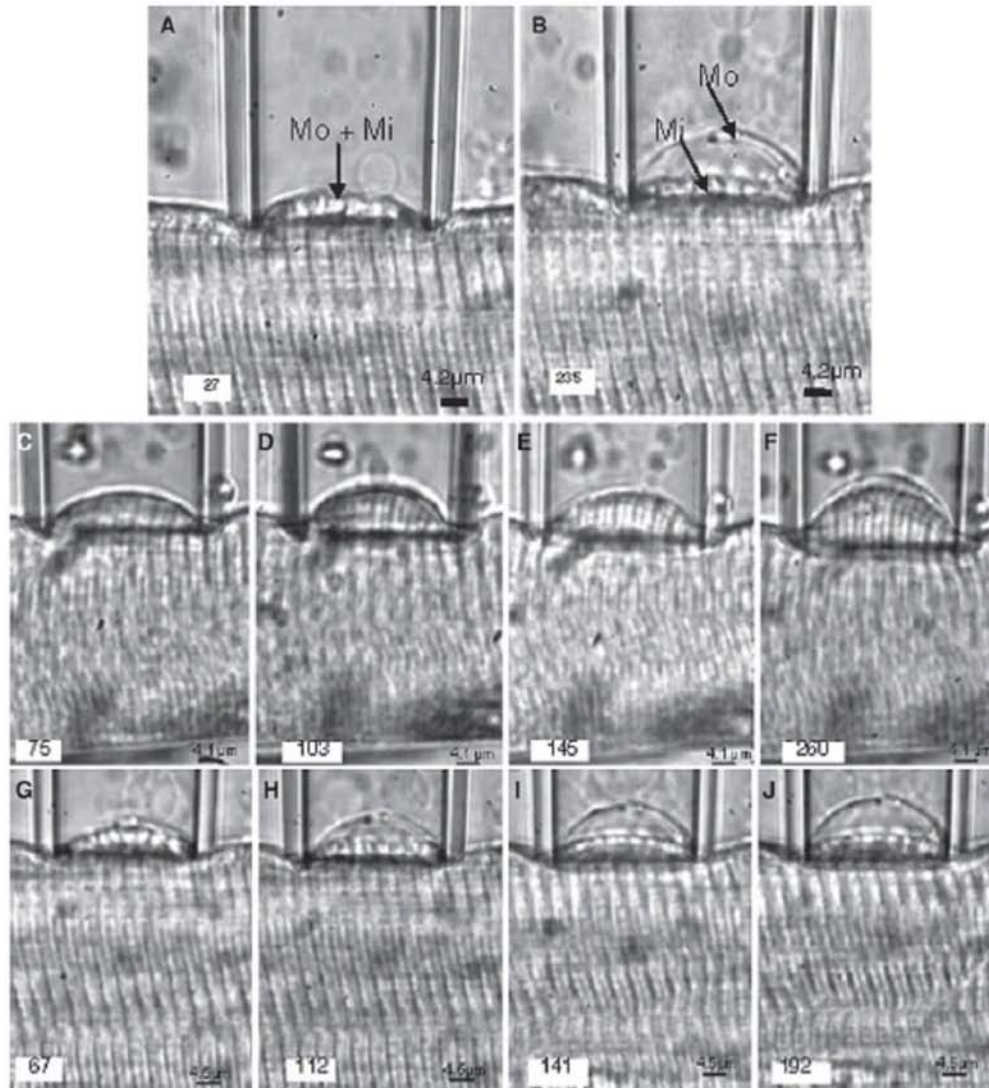


Fig. 2 Induction of a sarcolemmal bleb by increasing suction pressure. **a, b** Two different suction pressures were applied sequentially to the sarcolemma of a *WT* myofiber isolated from the EDL muscle of a mouse. The pipette diameter was $26.6\ \mu\text{m}$ and the fiber diameter was $55.1\ \mu\text{m}$. The fiber was stretched to an average SL of $3.2\ \mu\text{m}$. **a** The sarcolemma (M_o) and the contractile elements in the myoplasm (M_i) remained attached to each other as the bleb was sucked into the pipette at a pressure, $P = 27 \times 10^3\ \text{dynes/cm}^2$. **b** At a higher suction pressure, $P = 235 \times 10^3\ \text{dynes/cm}^2$, M_o was separated from M_i . As a result, the contractile apparatus lay well below the full height of the bleb within the pipette. The results show that the

muscle cell surface developed tension due to the stretching and resistance to deformation by bending. **c–j** Photomicrographs of different blebs forming with progressively increasing pressures. Separation of M_o and M_i with increasing suction pressure, is shown in muscle fibers from *WT* with a SL = $3.3\ \mu\text{m}$ (**c–f**) and *mdx* mice with SL = $3.4\ \mu\text{m}$ (**g–j**). $P \times 10^3$ in dynes/cm^2 is indicated in the left lower corner of each photomicrograph. The results indicate that, at similar SLs and P_s , the distensibility of the *WT* muscle surface was considerably lower than that of *mdx* muscle. The transparent lines outside the surface of the bleb are due to Becker lines and therefore do not represent real structures

failed to obtain a constant value for P , we moved the micropipette to another spot on the surface of the myofiber or we replaced the micropipette. If neither of these was effective, we discarded the myofiber. We continuously

checked the stability of P , except when the sarcolemma burst and P dropped slightly. We also periodically checked for the effectiveness of the seals by increasing and decreasing P . Typically, in myofibers in which the sarcolemma maintains

its links to the underlying contractile apparatus, the height of a bleb (h) increases as P increases, and decreases as P decreases, with no change in the slope of the P - h curve (no hysteresis). Such curves were taken as additional evidence of good seals (Fig. 3).

The elastic model proposed by Rapoport (1972) analyzes the elastic behavior of the distortion and tension lines formed by myofibrils and the sarcolemma in response to suction pressures, P , applied over a small area as a bleb is formed. We followed a similar treatment to analyze our experimental results. P in dyne/cm², applied to the outer surface of the myofiber was calculated from $P = \rho gh_{man}$, where ρ is the density of the manometer fluid in g/cm³, $g = 981$ cm/s² and h_{man} is the difference of levels in the manometer relative to $P = 0$ (Taylor 2005). We assumed that at equilibrium, when the height of the bleb becomes constant, the pressure inside the cell is the same as the suspending medium, whether this occurs before or after separation of the sarcolemma from the underlying structures. For each applied P , the height of the bleb formed inside the suction pipette, h , was measured in μm . At the SLs used for our studies, the diameters of the muscle fibers did not change noticeably as P increased and the bleb enlarged. As the total length of the myofiber does not change, the total cell volume therefore remains constant.

Once h was measured and P calculated, the average surface tension, γ in dyne/cm, was calculated, as follows:

$$P = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (\text{dyne/cm}^2) \quad (1)$$

where r_1 and r_2 are the radii of curvature of an asymmetric bent shell membrane. However, since the bleb is part of a symmetric sphere, then the centers of curvatures are the same. Therefore, $r_1 = r_2 = r$, the single radius of curvature (Rand 1964; Nelkon 1979; Pellicer et al. 2000). Thus

$$P = \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{dyne/cm}^2) \quad (2)$$

The radius, r , was computed from $r = d^2/8h + h/2$ (μm) from Pythagoras' Theorem (Dull 1941), where h and the pipette diameter d were measured. So substituting r in Eq. 2, it becomes:

$$P = \frac{2\gamma}{\left(\frac{d^2}{8h} + \frac{h}{2}\right)} \quad (\text{dyne/cm}^2) \quad (3)$$

From the P - h curves the tension of the whole system, γ_{t+s} (dyne/cm), before separation of the sarcolemma, M_o , from the contractile apparatus, M_i , was calculated from Eq. 3. The tension of the isolated sarcolemma after separation from the contractile apparatus, γ_o (dyne/cm),

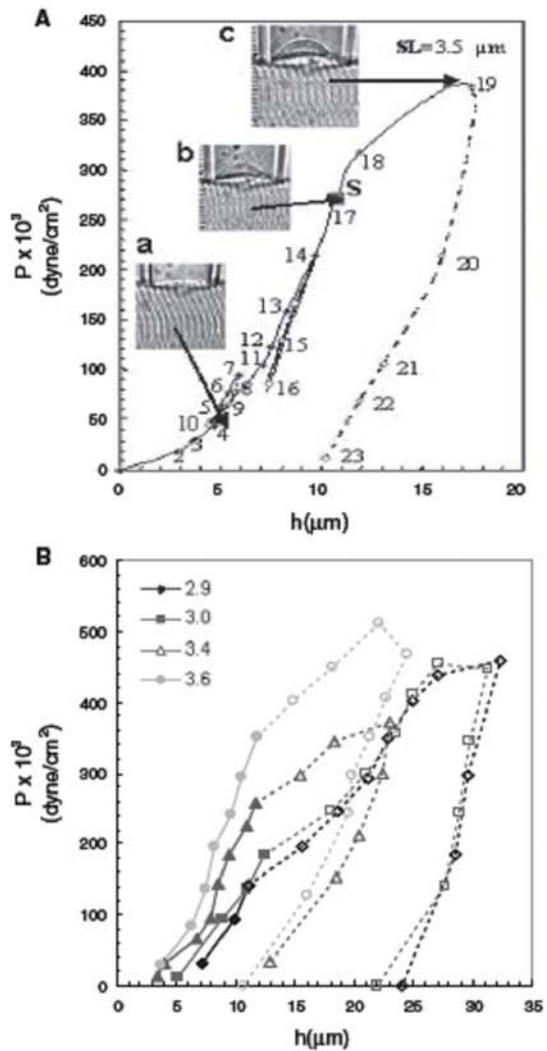


Fig. 3 Pressure–displacement curve and effect of SL in a WT muscle fiber. a P was first increased in steps (solid lines) and then decreased (dashed lines). S denotes the pressure at which separation of the sarcolemma from the underlying contractile structures, P_{sep} , occurred (point 17). *Insets* Photomicrographs of the bleb: (a) point 4, without separation of the sarcolemma, M_o , from the contractile elements, M_i . (b) point 17, at which M_o separated from M_i . (c) point 19, at which pressure was further increased after separation occurred. The results show hysteresis after point 19. b Separation of the sarcolemma from the contractile elements depends on SL. Pressure–displacement curves were generated in different WT myofibers, each of which was stretched to the SL indicated in the left upper corner of the figure. Filled symbols joined with solid lines are the segments of the curves before separation of the sarcolemma, M_o , from the contractile apparatus in the myoplasm, M_i . Open symbols joined with dashed lines are the remaining segments of the curves after separation of M_o from M_i . The results show that P_{sep} increases as SL increases

was also estimated with Eq. 3, from the experimental data in the segment of the P–h curve after separation of the surface membrane from the myoplasm. In this condition, the myofibrils do not contribute to the tension of the surface membrane, as measured with the elastimeter. As a result, we were unable to measure the biomechanical characteristics of the myofibrils (see Rapoport 1972 for additional considerations).

The attachments between the peripheral myofibrils and the sarcolemma are assumed to be due to structures that link the myofibrils at costameres. The separation of the sarcolemma from the most superficial myofibrils takes place when high pressures (P) are applied to the surface membrane. Since the separation of myofibrils from the sarcolemma occurs without breaking either structure, we propose that the break takes place in the structures that link the myofibrils to the sarcolemma, i.e. the costameres and closely associated cytoplasmic structures. Therefore, the tension exerted by costameres and closely associated cytoplasmic structures (γ_c) is obtained by the subtraction of γ_o and γ_i from γ_{i+o}

$$\gamma_{i+o} = \gamma_o + \gamma_i + \gamma_c \quad (\text{dyne/cm})$$

$$\text{Thus, } \gamma_c = \gamma_{i+o} - \gamma_o - \gamma_i \quad (\text{dyne/cm})$$

Because $\gamma_i = 0$ when the sarcolemma has separated from the contractile apparatus, it does not contribute to γ_c . Therefore,

$$\gamma_c = \gamma_{i+o} - \gamma_o \quad (\text{dyne/cm}) \quad (4)$$

The myofibrils, costameres and associated structures, and sarcolemma were considered as three different spring elements, each with its own elastic properties. The sarcolemma and myofibrils act as springs in parallel, linked at right angles by the spring-like elements at costameres. At equilibrium muscle length ($2 \mu\text{m/SL}$), the springs are not stretched but when the fiber is stretched to $>2 \mu\text{m/SL}$, the tension of each spring increases as a function of the SL.

The force, F, in dynes applied to the membrane at a given suction pressure is estimated from:

$$P = \frac{F}{A} \quad (\text{dyne/cm}^2) \quad (5)$$

Since the radius, r, of the pipette is always the same, we can estimate the area, A, of the segment of the spherical shell of the sarcolemma inside the pipette at different Ps. Therefore, $F = PA$ (dyne), where A in cm^2 is the area of the segment of the spherical shell bleb to which the force is applied. A can be calculated from $A = 2\pi rh$, where r and h are defined as above.

The stiffness or spring constant (k) is related to the ability of the cell to resist deformation when subjected to load (Leckie and Dal Bello 2009). This also represents the elasticity of the material under study. Specifically, the more elastic a material is, the less it is deformed by a given force.

Therefore, the less elastic the material, the more compliant it is. The breaking point is the maximum load that a system can support before a complete failure of the structure of the material in question. k was estimated from $F = kh$ (dyne) (Taylor 2005). Therefore,

$$k = \frac{F}{h} \quad (\text{dyne/cm}) \quad (6)$$

Other authors have also calculated cell stiffness (k), by measuring the applied force (F) and the displacement it caused on the cell membrane (Petersen et al. 1982; Pasternak et al. 1995; Pasternak and Elson 1985; Wojcikiewicz and Zhang 2004).

As surface tension is inversely proportional to temperature (Bull 1964), we performed our experiments at a constant temperature of $8.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The same fiber could be used for up to 4 h before showing signs of deterioration (e.g., spontaneous membrane blebbing, localized swelling, spontaneous localized changes of SL, or lack of reproducibility of the data obtained from nearby regions of the same fiber).

Data acquisition

Images were obtained with a digital camera (Nikon D-70 NY, USA) with an effective resolution of 6.1 Mpixels. The camera was placed above the microscope with an external device independent of the microscope and linked instrumentation, to avoid transmission of vibrations. Several images of the bleb were taken before and after the time at which the height of the bleb was stable, but for the measurements described here only the last ones were examined and used for quantification. Recoverable deformations in membranes have been observed and studied since the beginning of microscopic observations of cell morphology (Rand 1964; Evans and Hochmuth 1976). In our case after P was applied, it took some time for the bleb to reach a stable height, suggesting viscoelastic behavior (Rapoport 1972; Garcia-Pelagio et al. 2008), i.e., behavior resembling that of an elastic solid on short time-scales and of a viscous fluid on long time-scales (Boal 2006). The photographs were transferred to a PC with Adobe Photoshop™ 7.0.1. The measurements of the height, h, of the bleb formed inside the suction pipette were analyzed with Image J (NIH, Bethesda, MD). A microphotograph of a stage micrometer scale, calibrated in microns, was also taken and transferred to the PC, to determine the relationship between pixel number and μm .

Statistics

Data for tension, pressure and stiffness were analyzed with a 2-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc

analysis (Kruskal–Wallis). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. All results are reported as mean \pm standard deviation (SD). We also report the statistical population variance (V) of tension and pressure measurements, which indicates the degree of dispersion or scattering of the experimental data.

Source of materials

Unless indicated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Results

Elastimetry in mouse myofibers

The elastic properties of the sarcolemma and the strength of its connections to the underlying contractile apparatus were assessed by elastimetry. The method uses suction pressure (P), applied over a small sarcolemmal area (approximately $250 \mu\text{m}^2$) through a suction pipette. With myofibers at an average SL of $2 \mu\text{m}$ or less, application of negative pressure to the surface by a large bore suction pipette, with a diameter approaching that of the myofiber itself, the sarcolemma and nearby myoplasm were sucked into the pipette, without a significant change in surface tension. This also occurred at SLs $> 2 \mu\text{m}$ when we used large bore pipettes. However, at SLs above $2 \mu\text{m}$ and with micropipettes with tip diameters of 0.50 – $0.66 \mu\text{m}$ myofiber diameter, this did not occur; instead, the sarcolemma stretched and surface tension (γ) increased. These results are consistent with previous studies of frog myofibers (Rapoport 1972), but as the diameters of murine myofibers are half or less of frog myofibers, our experiments required much larger suction pressures, which we achieved with a different set of manometers (see “Materials and methods” section). At SLs $< 3 \mu\text{m}$ the sarcolemma has invaginations and caveolae (Dulhunty and Franzini-Armstrong 1975). During formation of blebs at short SLs, caveolae are unfolded as the suction pressure, P , is increased, raising the possibility that, at short SLs, the calculation of the surface tension may be misleading. We therefore also routinely obtained P – h curves at SLs $> 3.5 \mu\text{m}$, where further contributions of caveolae are likely to be minimal (Dulhunty and Franzini-Armstrong 1975). We ensured that the values we determined were at equilibrium, when the bleb no longer underwent changes in h .

When we used small bore micropipettes to study myofibers stretched to SLs $> 3.5 \mu\text{m}$, the application of suction pressure to the surface of the fiber induced the formation of a bleb of variable height, h , which was a function of both P and SL (Fig. 2a–j). At low negative

pressures, the sarcolemma and the associated contractile apparatus underlying it were drawn into the pipette together (Fig. 2a). The movement of contractile apparatus into pipette was small compared to the fiber diameter, which minimized changes in volume. Upon relaxation of P , h decreased and the bleb returned to its initial height. As the suction pressure increased, h increased, until at large negative pressures the sarcolemma (Fig. 2b; indicated by M_o) separated from the contractile apparatus, which remained distended (Fig. 2b; indicated by M_i), even when the pressure was relieved. Further increases in P produced further increases in h but had only minimal effects on nearby myofibrils (not shown, but see Rapoport 1972).

We obtained a series of microphotographs of sarcolemmal blebs that were formed with progressively increasing suction pressures in myofibers isolated from the EDL muscles of *WT* (Fig. 2c–f) and dystrophin-null, *mdx* (Fig. 2g–j) mice. We generated vertical pressure–displacement (P – h) curves from all fibers, and analyzed them to determine the blebbing behavior of the sarcolemma and nearby myofibrils as a function of P . We did not observe significant changes in the SL or nearby myofibrils that contributed to the formation of the bleb and its growth as P was gradually increased, suggesting that the sarcolemma and nearby myofibrils retained their structural relationship (Fig. 2). The relationship of the myofibrils to the SL did, however, change markedly when P was increased further, leading to the separation of these structures (see below).

Vertical bleb displacement, h , is a function of the suction pressure, P

The experimental pressure–displacement (P – h) curve for *WT* muscle showed three distinct segments (Fig. 3a). In the first, obtained at low suction pressures (Fig. 3a, points 2–16), the sarcolemma remained closely associated with nearby myofibrils under the bleb. The P – h relationship in this segment was reversible (Fig. 3a, points 8–10 and 14–16), with no hysteresis when P was reduced. Consistent with this, morphological observations indicated that the system formed by the contractile apparatus, costameres, and the sarcolemma remained intact.

In the next portion of the P – h curve (Fig. 3a, points 17–19), measured at higher suction pressures, the slope decreased. This decrease in slope was accompanied by the physical separation of the sarcolemma from the myofibrils (Fig. 3a, point S). Thus, in this range the sarcolemma distended more for the same increase in pressure, presumably because it was not restrained by links to contractile structures.

The third segment of the curve (Fig. 3a, points 19–23), obtained by reducing P after separation of the sarcolemma from underlying myofibrils, resulted in different values of h

at a given value of P than before separation. Larger changes in h occurred for the same changes in P , than in the rising portion of the curve. This hysteresis in the P - h curve indicates that the biomechanical system is different before and after separation of the sarcolemma.

We calculated the surface tension, γ , from the slope of the P - h curve (see “Elastimetry” section, in Materials and methods). For single, isolated myofibers from *WT* mice, the three segments of the curve yielded 3 distinct slopes, for the intact system, including the elastic constants (k_{i+o}) of myofibrils, costameres and sarcolemma, for the sarcolemma immediately after separation, and for the final segment, which reflects the elastic properties of the isolated sarcolemma (k_o). In wild type muscle, the elastic constant of the sarcolemma alone, k_o , was $\sim 80\%$ that of the intact system, k_{i+o} (Table 1). As the sarcolemma and myofibrils remain intact after separation, the links between them, established in part at costameres, are the weakest structures in the system.

We used the same methods to determine the P - h relationship in myofibers isolated from *mdx* mice. Although the shapes of the curves were similar, the values we obtained for the pressure at which separation occurred, P_{sep} , for surface tension, γ , and for k_{i+o} and k_o , were consistently ~ 2 -fold lower than in *WT* muscle (Table 1), suggesting that the stiffness of the system encompassing the sarcolemma, costameres and nearby myofibrils, and the strength of the connections between the sarcolemma and myofibrils, are significantly compromised when dystrophin is absent (Fig. 4a). In the absence of dystrophin, the sarcolemma is more easily distended at a given pressure, and the slopes of each phase of the P - h curves are greater in the *WT* than in the *mdx* (Fig. 4b).

The effect of SL

The slopes of the rising portions of the P - h curves showed a strong dependence on SL at pressures at which the sarcolemma remains attached to the underlying myofibrils. In particular, higher pressures were required to produce the same increase in h (Fig. 3b, solid lines). This suggests that the contractile apparatus contributes significantly to the stiffness of the sarcolemma in the intact system. This was not the case after sarcolemmal separation, however; these descending portions of the P - h curve showed little change

with SL, indicating that the contractile apparatus had no influence on the elasticity of the isolated sarcolemma.

P_{sep} was also a function of SL, with higher pressures needed to cause separation as SL increased (Figs. 3b, 4a). The change in P_{sep} was greatest at SLs from 3.6 to 4.3 μm . Changes at SLs between 2.9 and 3.4 μm (data not shown) were not statistically significant.

Consistent with the lower stiffness measured for the surface membrane and nearby myofibrils in *mdx* myofibrils, we found that P_{sep} was reduced by 2-fold at SLs between 3.6 and 4.3 μm (Fig. 4a; Table 1; $P > 0.05$). These results suggest that the sarcolemmal links to the myofibrils fibers are significantly weakened in *mdx* muscle.

Elastic behavior

The sarcolemma and nearby contractile apparatus can be modeled as an elastic body composed of three main elements, sarcolemma, costameres and myoplasm, each with its own elastic characteristics that together generate the elastic properties of the whole system. We first characterized the elastic properties, tension and stiffness, of the whole system and those of the costameres and sarcolemma, in *WT* mice and then compared the results with those obtained with *mdx* mice.

Using the Young-Laplace equation (Eq. 2) and the data in our P - h curves, we computed the total tension of the system, γ_{i+o} (Fig. 5a), the sarcolemmal tension, γ_o (Fig. 5b), and the maximal tension sustained by the costameres and their links to the myofibrils, γ_c (Fig. 5c). The value for γ_c was obtained by subtracting γ_o from γ_{i+o} (Table 1). The total tension sustained by the whole system and by the isolated sarcolemma in *WT* myofibers was significantly larger than for *mdx* myofibers at all SLs examined ($P < 0.05$). As γ_{i+o} increased for *WT* but not for *mdx* at SLs $> 3.6 \mu\text{m}$, these differences become greater. Similarly, γ_o for *WT* was consistently greater than for *mdx*, with the differences reaching significance ($P < 0.05$) at SLs between 3.8 and 4.3 μm . The calculated values for γ_c , obtained by subtracting γ_o from γ_{i+o} , were increased significantly at SLs of $\geq 3.4 \mu\text{m}$, with differences of ~ 5 -fold at longer SLs (Fig. 5c; Table 1).

We also examined the variance, V , of our measurements to assess the variability. The V of measurements of γ were

Table 1 P_{sep} , $P_{bouncing}$, k , γ_{i+o} , γ_o and γ_c , and the population variances, $V_{\gamma_{i+o}}$, V_o and V_{γ_c} expressed as mean \pm SD, calculated from all SLs examined

	$P_{sep} \times 10^3$ (dynes/cm ²)	$P_{bouncing}$ (dynes/cm ²)	k_{i+o} (dynes/cm ²)	k_o (dynes/cm ²)	γ_{i+o} (dynes/cm ²)	$V_{\gamma_{i+o}}$	γ_o (dynes/cm ²)	V_o	γ_c (dynes/cm ²)	V_{γ_c}
WT	367 \pm 26	631 \pm 47	1894 \pm 142	1524 \pm 96	188 \pm 21	46 \pm 5	151 \pm 25	30 \pm 4	37 \pm 6	4 \pm 1
<i>mdx</i>	171 \pm 19*	321 \pm 34*	989 \pm 204*	846 \pm 102*	99 \pm 10*	2 \pm 1	89 \pm 14*	3 \pm 1	11 \pm 4*	1 \pm 1

* Significant difference from control ($P < 0.05$ or lower)

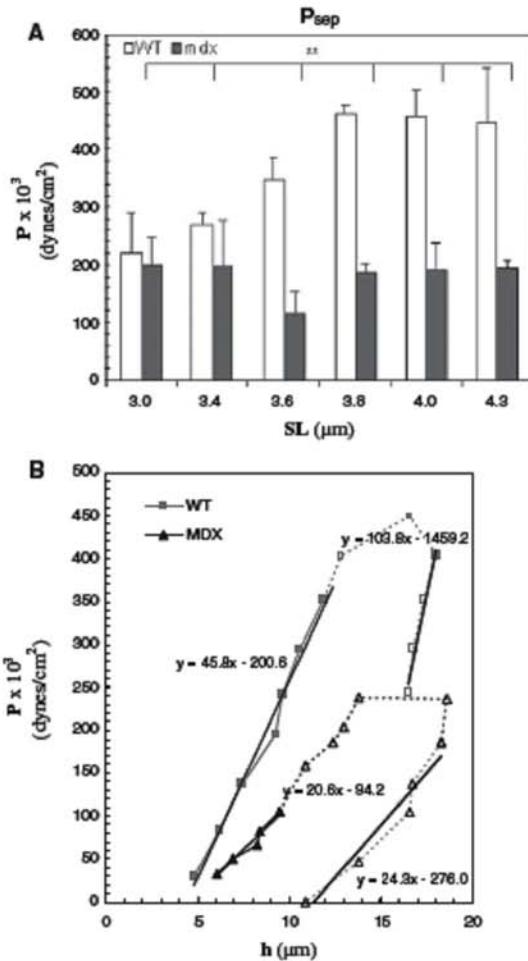


Fig. 4 Effect of SL on separation pressure in WT and *mdx* myofibers. **a** P_{sep} was determined for WT and *mdx* myofibers. Bars indicate mean \pm SD. ** indicates values significantly different from each other, $P < 0.01$. For all experiments ($n = 8$ for WT; $n = 5$ for *mdx*). In WT myofibers, the dependence of P_{sep} on SL was greater than in *mdx*. **b** Shift in the P-h curve in WT and *mdx* myofibers, stretched to an average SL of 3.5 μ m. Filled symbols and solid lines represent data obtained before separation of the sarcolemma, M_o from the contractile elements, M_i . Open symbols and dashed lines represent the data obtained after separation of M_o from M_i . S denotes the suction pressure at which separation occurred. The equations of the regression lines calculated from the equation, $y = mx + b$, are given next to each region of both curves. P_{sep} for *mdx* myofibers was smaller than for WT, indicating a weaker attachment of the sarcolemma to underlying contractile elements

generally greater for WT than for *mdx* (Table 1). We suggest that dystrophin is an elastic element, linking the sarcolemma to the contractile myofibers, which stretches as SL is increased.

We computed the stiffness (k) of the system and its elements as described above (Eq. 6) and the slope of the Force-displacement (F-h) curve (Fig. 5d, e). These values, too, decreased significantly in *mdx* myofibers compared to WT ($P < 0.01$; Table 1).

$P_{bursting}$ of the sarcolemma

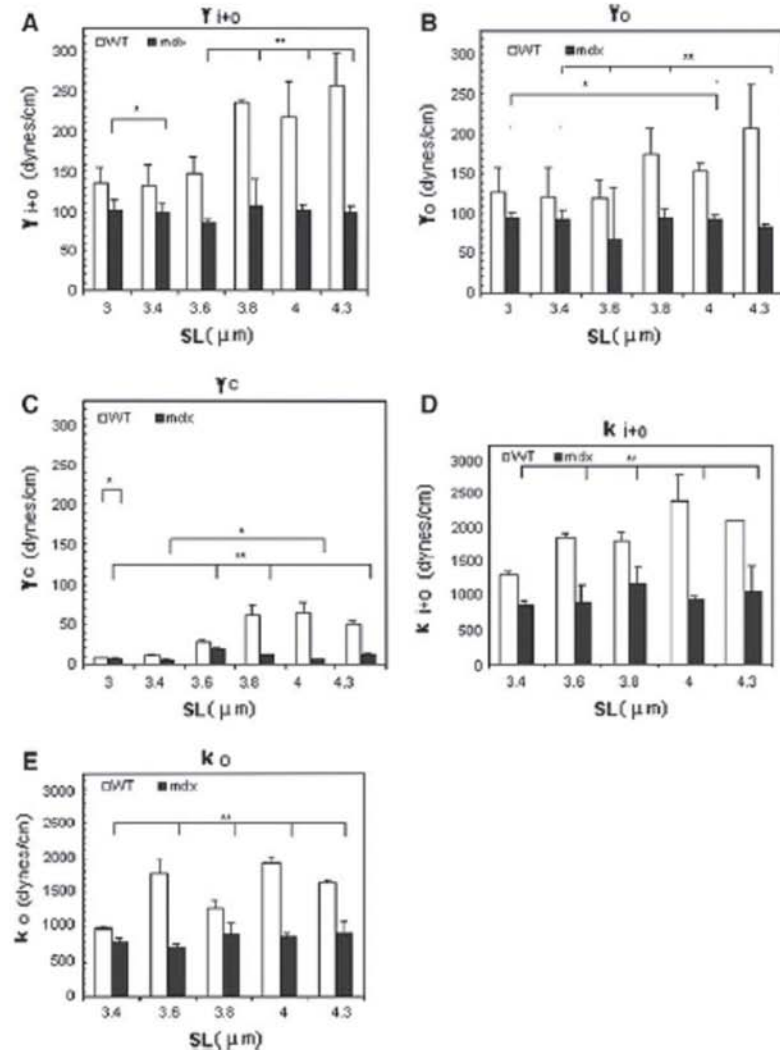
Further increases of suction pressure, P, after separation of the sarcolemma from nearby myofibrils, eventually caused the membrane bleb to burst (Fig. 6a, b). The pressure at which sarcolemmal bursting occurred, $P_{bursting}$, was independent of SL (Fig. 6c), as expected, but was consistently higher in WT than in *mdx* myofibers (Fig. 6a; Table 1; $P < 0.01$). This supports the idea that dystrophin stabilizes the sarcolemmal membrane, independent of its possible contributions at costameres and their links to nearby contractile structures.

Discussion

We used a modified elastimeter to measure the membrane bending elasticity of the sarcolemma of mammalian myofibers. A major advantage of this method is that the geometry and tension of the membrane is well controlled during the experimental measurements, which allowed us to quantify the changes in membrane area as a function of suction pressure (Evans and Hochmuth 1976; Needham and Hochmuth 1992), as well as related changes. In adapting a method originally designed for frog myofibers (Rapoport 1972), which are significantly larger than mammalian myofibers, we had to use micropipettes of smaller diameter, which in turn required manometers that could operate at much higher pressures. Our methods have allowed us to study several biomechanical properties of the surface of mature fibers of the murine EDL muscle, but they can easily be modified to study cells with very different surface rigidities. Given the high pressures needed to obtain detachment and bursting, other quantitative methods, including optical tweezers and atomic force microscopy, would likely be ineffective. Our results indicate that the elasticity and stability of the sarcolemma and the strength of its links to nearby myofibrils are severely compromised in the absence of dystrophin.

Our experiments are the first to determine the biomechanical properties of the sarcolemmal membrane and the links it establishes via costameres to nearby myofibrils. We achieved this by studying the properties of the sarcolemma while it remained attached to the underlying contractile apparatus, and after it separated from contractile structures at higher applied pressures. The properties of the isolated sarcolemma, obtained after detachment at higher pressures,

Fig. 5 Surface tensions (γ) and stiffness (k) in WT and *mdx* myofibers as a function of SL. The figure shows *histograms* of tensions of the total system (γ_{i+o} , a), the sarcolemma (γ_o , b) and the maximal tension sustained by the costameres and associated structures (γ_c , c; see text) at different SLs in WT and *mdx* myofibers. The *mdx* fibers had consistently lower values for γ and showed no dependence of γ on SL. d, e Stiffness was computed from Hooke's Law. d k_{i+o} stiffness sustained by the intact contractile apparatus–costameres–sarcolemma complex and e k_o , sarcolemmal stiffness, measured after separation of the sarcolemma. Bars indicate mean \pm SD. Both values were lower in *mdx* than WT muscle fibers. ** indicates values significantly different from each other, $P < 0.01$ and * denotes values significantly different from each other, $P < 0.05$ ($n = 7$ for WT and $n = 5$ for *mdx*)



were independent of SL. Comparison of the two conditions suggest that $\sim 80\%$ of the stiffness of the muscle cell surface is attributable to the sarcolemma and closely associated structures, including the membrane-associated cytoskeleton and the basement membrane. Nevertheless, the stiffness of the myofiber surface, with the sarcolemma connected to underlying contractile structures, is influenced by the latter, as increases in SL result in significant increases in stiffness (Table 1; Fig. 5d, e). This is consistent with the idea that much of the contractile force in skeletal muscle is transduced along lateral pathways of force transmission (e.g., Street 1983; Bloch and Gonzalez-Serratos 2003).

Our studies are also the first to assess the role of dystrophin in determining the biomechanical properties of the sarcolemma linked to nearby myofibrils, and of the sarcolemma immediately after detachment from contractile elements. Our measurements demonstrate that the absence of dystrophin in the EDL muscles of *mdx* mice decreases both the pressure needed to detach the sarcolemma from superficial myofibrils, P_{sep} , and the pressure needed to burst the sarcolemma, $P_{bursting}$. Our results suggest that the sarcolemma of muscle fibers lacking dystrophin is more compliant and less stable than control muscles. The role of dystrophin on isolated segments of the sarcolemma agrees with earlier studies that showed that dystrophin associates

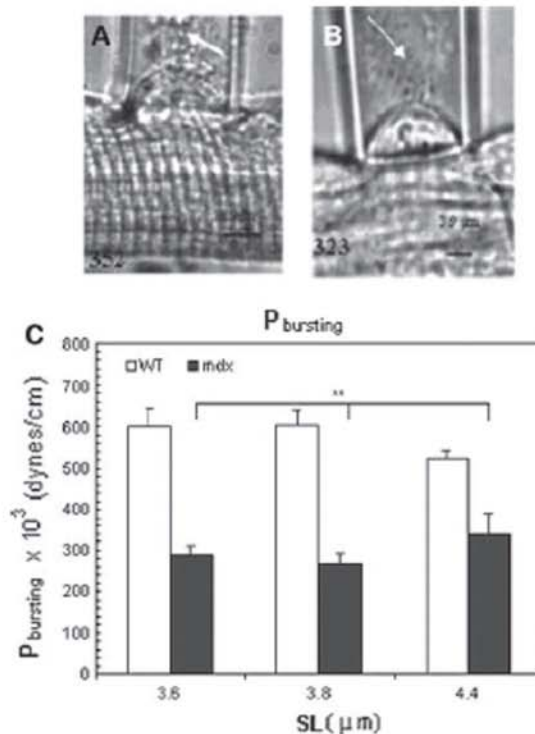


Fig. 6 Bursting of the sarcolemmal bleb at large negative pressures. Increasing negative pressures were applied to the surface membrane of the myofibers after separation of the sarcolemma from the underlying contractile structures, until the surface membrane burst (arrows). **a, b** Myofibers from WT (**a**) were studied at SL = 3.2 μm and from *mdx* mice (**b**) at SL = 3.3 μm . Values for $P \times 10^3$, in dyne/cm², at which each photomicrograph was taken, is given at the bottom of each image. **c** Histograms of bursting pressure P_{bursting} as a function of SL. At all SLs studied, P_{bursting} of myofibers from WT mice were approximately 2-fold higher than in *mdx* myofibers. Bars indicate mean \pm SD; ** indicate values significantly different from each other, $P < 0.01$ ($n = 5$ for WT and $n = 3$ for *mdx*)

with the sarcolemma when it is mechanically peeled away from the contractile apparatus (Rybakova et al. 2000). We cannot rule out the possibility that the absence of dystrophin leads to other, secondary changes at the sarcolemma or the extracellular matrix, including the basal lamina, collagen fibrils, or other proteins of the reticular lamina that may affect these properties. Nevertheless, our results suggest that dystrophin stabilizes the sarcolemma and participates in the links between that membrane and the contractile apparatus, anchored at costameres.

We were able to deduce some of the biomechanical properties of costameres by comparing the properties of the sarcolemma in two configurations, attached and detached from the underlying contractile apparatus. Our results suggest that costameres, and the links between the

sarcolemma and the contractile apparatus that they anchor, are significantly weaker than the sarcolemma itself, contributing only $\sim 20\%$ of the stiffness seen in the intact biomechanical system. As dystrophin is normally concentrated at costameres (Porter et al. 1992; Straub et al. 1991; Ervasti 2003) it is not surprising that the strength of these links is compromised in the *mdx* mouse. Several proteins are likely to interact with dystrophin to establish these links, including γ -actin, intermediate filaments composed of desmin and of keratins, as well as other proteins (Rybakova et al. 2000; O'Neill et al. 2002; Stone et al. 2007). Similar studies of muscles lacking each of these proteins should reveal how they contribute to the stability of costameres and the connectivity of the sarcolemma and contractile elements.

Analysis of the statistical variance, V , of our values for P_{sep} offers additional insights into the nature of the costameres and their links to the contractile apparatus. The variance of P_{sep} with SL is considerably lower for *mdx* than WT (100 ± 10 for WT, 9 ± 3 for *mdx*). This indicates that if an important elastic element, such as dystrophin, is missing, the system becomes more compliant. When the surface membrane is attached to underlying myofibrils via costameres, stretching the links will produce a larger change in force than when these links are broken, and this in turn will produce a higher variance.

Comparison of our results with those obtained in the semitendinosus muscles of *Rana pipiens* suggests that the sarcolemma of the latter is weaker than that of the mouse EDL muscle. At SLs of 4 μm , Rapoport (1972) measured an average $\gamma = 45$ dyne/cm for the frog semitendinosus. Our values are 3–5-fold higher. Similar differences are also found at shorter SLs. Although some of the difference may be due to temperature (22°C, compared to 8°C, used here), which affects surface tension (Bull 1964), studies of single EDL fibers at different temperatures indicate that the Q_{10} for total surface tension is ~ 3.9 (not shown), which is not sufficient to account for the different values for γ in frog and mouse muscles. The higher total surface tension of the EDL myofibers may be due to the presence in mammalian striated muscle of costameres that link superficial myofibrils to the sarcolemma at the levels of the Z-disks and M-bands, and that may also include longitudinal elements. By contrast, amphibian semitendinosus myofibers have costameres only at the level of Z-disks (Street 1983; Gonzalez-Serratos, unpublished results). The presence of more links in EDL muscles would produce stiffer surface membranes and larger surface tensions. As a substantial percentage of active force is transmitted laterally through the costameres to the tendons (Street 1983; Bloch and Gonzalez-Serratos 2003), the higher density of costameres in mammalian muscle may explain why a single murine flexor digitorum brevis myofiber generates a specific force

of 362 kPa (Allen et al. 2008), compared to 275 kPa for an isolated amphibian muscle cell (Gordon et al. 1966), when both are measured at optimal SL.

The images of Williams and Bloch (1999a, b) suggest that costameres cover approximately half of the surface membrane of fast twitch muscle fibers. At an average SL of 2.9 or 3.6 μm , the pressure exerted on sarcolemma just before it separates from the underlying contractile apparatus is approximately 2.6×10^9 Pa. If this pressure is distributed evenly across all domains of the costameres, then the pressure exerted on the links between the contractile apparatus and the sarcolemma, present at costameres, would be approximately twice this value, or approximately 5.2×10^9 Pa. We previously estimated that during a maximal tetanic contraction the lateral pressure exerted on the sarcolemma is approximately 6×10^5 Pa (Bloch and Gonzalez-Serratos 2003). This indicates that the costameres have a safety factor of several orders of magnitude that would make it highly unlikely for them to break during normal muscle function or even during a maximal lengthening contraction.

Even in their weakened state, in the *mdx* muscle, costameres should be more than strong enough to withstand damage caused by contractile activity. Thus, damage to the sarcolemma that occurs during forceful contractions, in *mdx* as well as in wild type muscle, is likely to arise from areas between the costameres, the “intercostameric regions”, which lack many of the structural proteins that reinforce the costameres themselves (Williams and Bloch 1999b). The fact that dystrophin and its associated proteins are present in the intercostameric regions of wild type muscle, but not *mdx* muscle (Williams and Bloch 1999b), may therefore account for the greater susceptibility of the latter to damage linked to contractile activity.

Other authors have used aspiration pipettes to measure cell surface tension (γ) in a variety of cells. In neutrophils, Needham and Hochmuth (1992) extrapolated the tension in a resting membrane at room temperature and obtained a $\gamma = 2.4 \times 10^{-2}$ dyne/cm, similar to the value of 2.7×10^{-2} dyne/cm reported by Tsai et al. (1993). In granulocytes, Evans and Yeung (1989) found $\gamma = 3.5 \times 10^{-2}$ dyne/cm for granulocytes while Trans-Son-Tay et al. (1991) reported a value of 2.4×10^{-2} dyne/cm. In chick embryo fibroblasts, Thoumine et al. (1999) and Rand (1964) found a maximum $\gamma = 2.4$ dyne/cm, while Waugh and Evans (1979) reported $\gamma = 6.6$ dyne/cm. Hutter et al. (1991) measured the tension of isolated sarcolemmal vesicles alone (“sarcoballs”) obtained from semimembranosus muscles by exposing excised muscles to KCl and collagenase at room temperature. They reported an average bursting tension of 6 dyne/cm in sarcoballs from myofibers of *WT* mice and of 5.2 dyne/cm in sarcoballs of myofibers from *mdx* mice. The difference is smaller than the one we found here. This

smaller difference is probably due to the fact that sarcoballs are spheres composed of the sarcolemma alone, and that many peripheral membrane proteins, such as dystrophin, may be shed from the cytoplasmic surface of the sarcolemma as sarcoballs form.

Using a different approach, Pasternak et al. (1995) reported that the stiffness of myotubes prepared from *mdx* mice was 3.4 dyne/cm, several fold lower than the value of 12.3 dyne/cm that they measure for controls. As myotubes lack an organized contractile apparatus and do not readily form costameres (Bloch, unpublished results; but see Quach and Rando 2006), the fact that they were considerably less stiff than myofibers (our values for stiffness are considerably higher) is not surprising. Their use of cells in culture prevented Pasternak et al. (1995) from controlling SL, and the glass rods they employed to indent the surface membranes also did not allow them to control for the contribution of caveolae to the membrane as it deformed. Both of these factors also contribute to the lower values they obtained. The higher values that we report for the surface membrane of intact skeletal muscle fibers are likely due to presence of an extensive membrane-associated cytoskeleton that underlies the sarcolemma and that links it to contractile structures (Porter et al. 1992; Williams and Bloch 1999a; Hutter et al. 1991; Na et al. 2009).

Bobet et al. (1998) and Wolff et al. (2006) reported that there were no differences in the passive mechanical or active contractile properties of whole EDL muscles from *mdx* and control mice. It is difficult to compare results obtained with whole muscles to single isolated myofibers, because of the many additional elastic elements present in the former, some of which increase in *mdx* muscle (Goldspink et al. 1994). As we find that the surface of *mdx* myofibers is more compliant than controls, the changes in the extracellular matrix (and possibly other structures lying between myofibers) in *mdx* mice are likely to compensate for this increased compliance in whole muscles. The fact that the stiffness of the surface of *mdx* myofibers is ~ 100 fold greater than that of *WT* or *mdx* myotubes is consistent with the idea that, despite its importance for the health of muscle and the stability of the sarcolemma, factors other than dystrophin play important roles in determining the biomechanical properties of the muscle cell surface. The absence of dystrophin results in a decrease in the lateral transmission of passive force, linked to changes in the properties of costameres. The decrease in costameric strength and stiffness in *mdx* myofibers could also lead to a decrease in the lateral transmission of active force during contraction (Street 1983; Bloch and Gonzalez-Serratos 2003). We are currently studying the roles of several other proteins that are enriched at costameres, with the goal of developing a comprehensive physical model of these structures and how they contribute to lateral force transmission.

Acknowledgments This research was partially supported by grants to R. J. Bloch from the National Institute of Health (5R01AR055928) and the Muscular Dystrophy Association. K. P. García-Pelagio was supported during the Ph. D. program (Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

References

- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88:287–332
- Anastasi G, Cutroneo G, Santoro G, Arco A, Rizzo G, Bramanti P, Rinaldi C, Sidioti A, Amato A, Favalaro A (2008) Costameric proteins in human skeletal muscle during muscular inactivity. *J Anat* 213(3):284–295
- Ayalon G, Davis J, Scotland P, Bennett V (2008) An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* 135(7):1189–1200
- Barton E (2006) Impact of Sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(2):C411–C419
- Beedle A, Nienaber P, Campbell K (2007) Fukutin-related protein associates with the sarcolemmal dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 282(23):16713–16717
- Bhosle R, Michele D, Campbell K, Li Z, Robson R (2006) Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 346(3):768–777
- Blaauw B, Mammucari C, Toniolo L, Agate L, Abraham R, Sandri M, Reggiani C, Schiaffino S (2008) Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 17(23):3686–3696
- Blaauw B, Agate L, Toniolo L, Canato M, Quarta M, Dyar K, Danieli-Betto D, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C (2010) Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 108(1):105–111
- Bloch R, Gonzalez-Serratos H (2003) Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 31(2):73–78
- Bloch R, Capetanaki Y, O'Neill A, Reed P, Williams MW, Resneck W, Porter N, Ursitti J (2002) Costameres: repeating structures at the sarcolemma of skeletal muscle. *Clin Orthop Relat Res* 403S:S203–S210
- Boal D (2006) *Mechanics of the cell*. Cambridge University Press, Cambridge
- Bobet J, Mooney RF, Gordon T (1998) Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles. *Muscle Nerve* 21(4):536–539
- Brennan J, Chao D, Xia H, Aldape K, Bredt D (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscles sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82(5):743–752
- Bull H (1964) *An introduction to physical biochemistry*. Davis Co, Philadelphia
- Campbell K, Stull T (2003) Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem* 278(15):12599–12600
- Caputo C, Bolaños P (1994) Fluo-3 signals associated with potassium contractures in single amphibian muscle fibers. *J Physiol* 481:119–128
- Claffin D, Brooks S (2008) Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C651–C658
- Dmytrenko G, Pumpin D, Bloch R (1993) Dystrophin in membrane skeletal network: localization and comparison to other proteins. *J Neurosci* 13(2):547–558
- Dulhunty AF, Franzini-Armstrong C (1975) The relative contribution of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibers at different sarcomere length. *J Physiol* 250:513–539
- Dull RW (1941) *Mathematics for engineers*. McGraw-Hill Book Company, New York
- Ehmer S, Herrmann H, Bittner R, Voit T (1997) Spatial distribution of beta-spectrin in normal and dystrophic human skeletal muscle. *Acta Neuropathol* 94(3):240–246
- Ervasti J (2003) Costameres: the Achilles' heel of herculean muscle. *J Biol Chem* 278(16):13591–13594
- Ervasti J (2007) Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochem Biophys Acta* 1772(2):108–117
- Ervasti J, Campbell K (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66(6):1121–1131
- Ervasti J, Campbell K (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122:809–823
- Evans E, Hochmuth M (1976) Membrane viscoelasticity. *Biophys J* 16(1):1–11
- Evans E, Yeung A (1989) Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipette aspiration. *Biophys J* 56:151–160
- Fonbrune P (1949) *Technique de Micromanipulation*. Masson et Cie, Paris
- García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, Gonzalez-Serratos H (2006) Elastic properties of the sarcolemma-costamere complex of muscle cells in normal mice. *AIP Conf Proc* 854:51–53
- García-Pelagio K, Bloch R, Ortega A, Gonzalez-Serratos H (2008) Passive viscoelastic properties of costameres in EDL muscle in normal and dystrophin null mice. *AIP Conf Proc* 1032:268–271
- Goldspink G, Fernandes K, Williams PE, Wells DJ (1994) Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. *Neuromuscul Disord* 4(3):183–191
- Gonzalez-Serratos H (1971) Inward spread of activation in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 212(3):777–799
- Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. *J Physiol* 184:170–192
- Hochmuth M (2000) Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 33:15–22
- Hoffman EP, Brown R, Kunkel L (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919–928
- Hutter OF, Burton FL, Bovell DL (1991) Mechanical properties of normal and mdx mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. *J Muscle Res Cell Motil* 12:585–589
- Lapidos K, Kakkar R, McNally M (2004) The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94:1023–1031
- Leckie FA, Dal Bello DJ (2009) *Strength and stiffness of engineering systems*. Springer, New York
- Minetti C, Cordone G, Beltrame F, Bado M, Bonilla E (1998) Disorganization of dystrophin costameric lattice in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21(2):211–216
- Mitchison JM (1953) The thickness of the sea urchin fertilization membrane. *Exp Cell Res* 5(2):536–538
- Na S, Chowdhury F, Tay B, Ouyang M, Gregor M, Wang Y, Wiche G, Wang N (2009) Plectin contributes to mechanical properties of living cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(4):C868–C877

- Needham D, Hochmuth M (1992) A sensitive measure of surface stress in the resting neutrophil. *Biophys J* 61(6):1664–1670
- Nelkon M (1979) *Scholarship physics*. Hienemann Educational Publishers, London
- Nigro V, Filuso G, Belsito A, Politano L et al (1996) Identification of a novel sargoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 5(8):1179–1186
- Nowak K, Davies K (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 5:872–876
- O'Neill A, Williams MW, Resneck W, Milner D, Capetanaki Y, Bloch RJ (2002) Sarcolemmal organization in skeletal muscle lacking desmin: evidence for cytokeratins associated with membrane skeleton at costameres. *Mol Biol Cell* 13:2347–2359
- Oak SA, Zhou YW, Jarrett HW (2003) Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J Biol Chem* 278(41):39287–39295
- Ohtendieck K, Ervasti I, Snook J, Campbell K (1991) Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J Cell Biol* 112:135–148
- Ozawa E (1998) From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21:421–438
- Pasternak C, Elson E (1985) Lymphocyte mechanical response triggered by cross-linking surface receptors. *J Cell Biol* 100:860–872
- Pasternak C, Wong S, Elson E (1995) Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 128(3):355–361
- Pellicer J, García-Morales V, Hernández MJ (2000) On the demonstration of the Young-Laplace equation in introductory physics courses. *Phys Educ* 35(2):126–129
- Petersen LN, McConnaughey W, Elson E (1982) Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin B. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5327–5331
- Petrof B, Shrager J, Stedman H, Kelly A, Sweeney L (1993) Dystrophin protect the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3710–3714
- Porter G, Dmytrenko G, Winkelmann J, Bloch R (1992) Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol* 117(5):997–1005
- Quach NL, Rando TA (2006) Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *Dev Biol* 293:38–52
- Rand RP (1964) Mechanical properties of the red cell membrane. *Biophys J* 4:303–316
- Rapoport S (1972) Mechanical properties of the sarcolemma and myoplasm in frog muscle as a function of sarcomere length. *J Gen Physiol* 59:559–585
- Reed P, Bloch RJ (2005) Postnatal changes in sarcolemmal organization in mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 15(8):552–561
- Rybakova I, Patel J, Ervasti J (2000) The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 150(5):1209–1214
- Shah S, Davis J, Weisleder N, Kostavassili I, McCulloch A, Ralston E, Capetanaki Y, Lieber R (2004) Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys J* 86:2993–3008
- Stone MR, O'Neill A, Lovering R, Strong J, Resneck WG, Reed PW, Toivola D, Ursitti I, Omary BM, Bloch RJ (2007) Absence of keratin 19 in mice causes skeletal myopathy with mitochondrial and sarcolemmal reorganization. *J Cell Sci* 120(22):3999–4008
- Straub V, Bittner R, Leger J, Voit T (1991) Direct visualization of the dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J Cell Biol* 119(5):1183–1191
- Street SE (1983) Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters. *J Cell Physiol* 114:346–364
- Taylor R (2005) *Classical mechanics*. University Science Books, Sausalito
- Thoumine O, Cardoso O, Meister JJ (1999) Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading: a micro-manipulation study. *Eur Biophys J* 28(3):222–234
- Trans-Son-Tay R, Needham D, Yeung A, Hochmuth M (1991) Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation. *Biophys J* 60(4):856–866
- Tsai M, Frank R, Waugh R (1993) Passive mechanical behavior of human neutrophils: power law fluid. *Biophys J* 65:2078–2088
- Ursitti JA, Lee PC, Resneck WG, McNally MM, Bowman AL, O'Neill A, Stone MR, Bloch RJ (2004) Cloning and characterization of cytokeratins 8 and 19 in adult rat striated muscle. Interaction with the dystrophin glycoprotein complex. *J Biol Chem* 279(40):41830–41838
- Waugh E, Evans E (1979) Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophys J* 26:115–132
- Wieneke S, Stehle R, Li Z, Jockusch H (2000) Generation of tension by skinned fibers and intact skeletal muscles from desmin-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 278:419–425
- Williams MW, Bloch RJ (1999a) Extensive but coordinate reorganization of the membrane skeleton in myofibers of dystrophic (mdx) mice. *J Cell Biol* 144:1259–1270
- Williams MW, Bloch RJ (1999b) Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 20:383–393
- Winder S (1997) The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J Muscle Res Cell Motil* 18:617–629
- Wojcikiewicz E, Zhang X, Moy V (2004) Force and compliance measurements on living cells using Atomic Force Microscopy (AFM). *Biol Proced Online* 6:1–9
- Wolff AV, Niday AK, Voelker KA, Call JA, Evans NP, Granata KP, Grange RW (2006) Passive mechanical properties of maturing extensor digitorum longus are not affected by lack of dystrophin. *Muscle Nerve* 34(3):304–312
- Zhang Q, Wang X, Wei X, Chen W (2007) Characterization of viscoelastic properties of normal and osteoarthritic chondrocytes in experimental rabbit model. *Osteoarthr Cartil* 16(7):837–840
- Zubrzycka-Gaam E, Bulman D, Karpati G et al (1988) The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333(6172):466–469