

ANALISIS DE LA SECCION ECUATORIAL DEL PATRON DE DIFRACCION DE RAYOS -X DE MUSCULOS ESTRIADOS DE TARANTULA EN DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES

Hernando Sosa*, Nelly Pante*
y Raúl Padrón
Laboratorio de Biofísica del Músculo
IVIC-BIOFISICA. - Apdo. 21827
Caracas 1020-A, - Venezuela.

RESUMEN

Recientemente ha sido descrita la disposición de las cabezas de miosina en la superficie de los filamentos gruesos de músculos estriados de tarántula con una resolución de 5 nm. El conocer dicha estructura a tal resolución, permite una interpretación más realista de la información estructural obtenida por difracción de rayos-X. Con tal finalidad hemos realizado un estudio por difracción de rayos-X en tales músculos estriados, en el cual registramos la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X de músculos de *Avicularia* sp. vivos y desmembrados químicamente. En los patrones correspondientes a músculos vivos (no estimulados) la relación de intensidades entre las tres primeras reflexiones fue $I_{10} > I_{11} \approx I_{20}$. Para longitudes del sarcómero entre 5,6 y 8,5 μm , el espaciado entre los filamentos de miosina (d_m) varió entre 60 y 48,6 nm, manteniéndose aproximadamente constante el volumen del retículo. Para el caso de los músculos desmembrados se observaron cambios reversibles en los patrones de difracción y en los registros mecánicos, al transferirlos de la solución relajadora (5 mM ATP, 5 mM EGTA) a la solución de rigor (0 mM ATP, 5 mM EGTA) y viceversa. En solución relajadora, la relación de intensidades fue similar a la correspondiente a músculos vivos ($I_{10} > I_{11} \approx I_{20}$), mientras que al pasar los músculos a la solución de rigor, dicha relación se invirtió ($I_{10} < I_{11} \approx I_{20}$), generándose tensión mecánica de rigor. Las estructuras correspondientes a cada patrón de difracción fueron calculadas mediante síntesis de Fourier, incluyendo las tres primeras reflexiones ecuatoriales: 10, 11 y 20 (resolución 224 nm). Dichas estructuras indican que cuando el músculo pasa del estado relajado al de rigor, los filamentos gruesos pierden aproximadamente el 27 por ciento de su masa y ésta es desplazada hacia los filamentos delgados. Esta cantidad de masa representa el 61 por ciento de las cabezas de miosina del filamento grueso del músculo estriado de tarántula.

* Dirección actual: Department of Biology, Rosenstil Basic Medical Sciences Research Center, Brandeis University, Waltham, Mass 02254, USA.

ABSTRACT

Recently the myosin heads arrangement on the thick filament surface from tarantula muscle has been determined with 5 nm resolution. This high resolution information could allow a more realistic interpretation of the structural information obtained by X-ray diffraction. With this aim we have done a X-ray diffraction study with these muscles, recording the equatorial X-ray pattern of live and chemically skinned muscles of *Avicularia* sp. The ratio between the three first reflections corresponding to a live muscle pattern was $I_{10} > I_{11} \approx I_{20}$. For sarcomere lengths between 5.6 and 8.5 μm , the thick to thick filament distance (d_m) changed between 60 and 48.6 nm with the sarcomere volume nearly constant. In the case of skinned muscles reversible changes in the X-ray pattern and mechanical response were recorded when the muscles were transferred from a relaxing solution (5 mM ATP, 5 mM EGTA) to a rigor solution (0 mM ATP, 5 mM EGTA) and vice versa. In relaxing solution, the intensities ratio was similar to live muscle ($I_{10} > I_{11} \approx I_{20}$) whereas in rigor solution the ratio was the opposite ($I_{10} < I_{11} \approx I_{20}$) and the muscles produced rigor tension. The structures corresponding to each X-ray pattern were calculated by Fourier synthesis, including the three first reflections: 10, 11 and 20 (resolution 224 nm). These structures showed that when the muscles changed from the relaxed to the rigor state the thick filaments lost about 27 per cent of mass and this was transferred to the thin filaments. This mass amount represent 61 per cent of myosin heads of tarantula muscle thick filament.

INTRODUCCION

Gran parte de la información que hoy día se tiene acerca del mecanismo de la contracción muscular proviene del estudio de la estructura de los filamentos contráctiles, mediante el uso paralelo de técnicas de microscopía electrónica y de difracción de rayos-X.^{5,18} Las últimas, a diferencia de las primeras, permiten trabajar con músculos en condiciones fisiológicas; pero, en cambio, debido al problema de la fase, no permiten una determinación inequívoca de la estructura. Este problema se ve simplificado en el análisis de la sección ecuatorial del patrón de difracción de los músculos estriados, debido a que dicha sección da información acerca de la estructura transversal del arreglo de miofilamentos y ésta es centrosimétrica en los casos estudiados (por lo menos a baja resolución). El patrón de difracción ecuatorial de rayos-X se ha utilizado comúnmente para determinar cómo se distribuyen las cabezas de miosina alrededor de los filamentos.^{5,7,18}

Dependiendo del estado fisiológico del músculo, el patrón de difracción de rayos-X correspondiente presenta características particulares, las cuales evidencian las diferentes estructuras que presentan los filamentos contráctiles a lo largo del ciclo de la contracción muscular.⁵ Uno de los problemas para interpretar el origen de los cambios mencionados es que no se conoce, exactamente, cómo se organizan las cabezas de miosina a lo largo del filamento grueso en las prepa-

raciones musculares que han sido estudiadas por difracción de rayos-X. Sin embargo, recientemente, mediante microscopía electrónica (ME) se ha determinado, con una resolución de 5 nm, la disposición que presentan las cabezas de miosina en el estado relajado, a lo largo del filamento grueso de músculo de extremidad de tarántula.³ Con la finalidad de aprovechar esta información previa, no disponible en la actualidad para otras preparaciones, el objetivo del presente trabajo es el de registrar la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X de músculos estriados de tarántula en diferentes estados relacionados con el ciclo de la contracción muscular e interpretar dichos patrones en base a la información previa de ME. Para poder inducir los diferentes estados, se implementó un método de desmembramiento químico para los músculos utilizados, que permitiera el acceso de soluciones experimentales al arreglo de miofilamentos. Específicamente los estados estudiados por los métodos desarrollados, fueron el de relajamiento (Mg-ATP y EGTA), el de rigor (sin ATP) y el de músculos vivos (no desmembrados) en reposo.

MATERIAL Y METODOS

Procedimiento experimental:

Se registraron los patrones de difracción ecuatorial de los músculos de extremidad de tarántula, a los cuales se les midió la longitud del sarcómero antes y después de la exposición a los rayos-X.

Músculos vivos: Después de realizar la disección se verificó la capacidad de estos para producir una contracción simple por estimulación eléctrica y se procedió a registrar la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X. Al finalizar la exposición a la radiación, se verificó de nuevo la capacidad de respuesta a la estimulación eléctrica.^{19,20}

Músculos desmembrados: Luego de disecar y desmembrar los músculos, se procedió a registrar sus patrones de difracción de rayos-X en presencia de la solución relajadora y en la solución de rigor. Así se obtuvieron, en secuencia, cuatro patrones: 1) en solución relajadora; 2) en solución de rigor; 3) nuevamente en solución relajadora, y 4) nuevamente en solución de rigor. Simultáneamente, con el registro de los patrones se midió la tensión mecánica producida por los músculos.

Preparación utilizada:

En este trabajo se utilizó el músculo flexor *metatarsi longus*, ubicado en el segmento tibial de las extremidades de las arañas (*Avicularia* sp.). La disección fue realizada en la solución "Ringer de tarántula".

Soluciones utilizadas:

Solución "Ringer de tarántula": 190 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 4 mM de MgCl₂ y 1 mM de solución tampón de fosfato (Na); pH = 7,8. Esta es la solución propuesta por Schartau y Leidescher.¹⁶

Solución Relajadora: 100 mM de K(CH₃COO), 5 mM de Mg(CH₃COO)₂, 5 mM de NaN₃, 5 mM de EGTA, 5 mM de ATP, 15 mM de solución tampón de fosfato (K); pH = 7,2 y 2 por ciento de polivinilpirrolidona (PVP-40). Esta solución es similar a la utilizada por Padrón y Huxley,¹⁴ pero con valores ligeramente superiores de pH y concentración de acetato de potasio. Para desmembrar los músculos se utilizó esta solución, pero con un pH de 6,3, ya que esto mejora el desmembramiento.^{14,20}

Solución de Rigor: Su composición es igual a la de la solución relajadora, con la diferencia de que ésta no contiene ATP.

Método de desmembramiento:

Para eliminar los sistemas membranosos de las fibras musculares y permitir que las soluciones de rigor y relajamiento tuvieran acceso a los miofilamentos, se utilizó un método de desmembramiento químico similar al utilizado por Padrón y Huxley:^{14,20,21} Una vez realizada la disección de los músculos en la solución "Ringer de tarántula", estos se fijaron en un soporte especial y se introdujeron en un vial con solución relajadora (pH = 6,3) durante 15 minutos, a 4 °C. Seguidamente se agregó Tritón X-100 hasta alcanzar una concentración final de 0,5 por ciento v/v y se procedió a agitar el vial con los músculos, durante 3 horas, a 60 rpm (24 °C). Luego se enjuagaron varias veces los músculos con solución relajadora (pH = 7,2) y se procedió con los experimentos.

Longitud del sarcómero:

Se determinó la longitud del sarcómero de los músculos, antes y después de exponerlos a los rayos-X, midiendo el espaciado entre las reflexiones de sus correspondientes patrones de difracción ópticos. Para ello se utilizó un generador de rayos láser de He/Ne Spectra-Physics (mod. 157, $\lambda = 0,6328 \mu\text{m}$, 3,0 mW).

Registro de tensión:

Se midió la tensión producida por los músculos durante los experimentos, mediante un transductor de puente resistivo UFI conectado a un preamplificador (Analog Devices AD521KD) y éste a un osciloscopio.²⁰

Difracción de rayos-X:

Se usó un generador de rayos-X "Siemens Kristalloflex 810" de tubo sellado y ánodo de cobre, para generar un haz que fue enfocado y monocromatizado a la radiación CuK ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$) mediante un cristal monocromador de cuarzo. La distancia entre la muestra (músculo) y el sistema de registro fue de 506 mm. Los patrones de difracción fueron registrados en película fotográfica "CEA-VERKEN" para rayos-X y los tiempos de exposición, necesarios para detectar al menos las tres primeras reflexiones ecuatoriales, variaron entre 4 y 14 horas, dependiendo del tamaño de la mues-

tra. Los registros fotográficos fueron densitometrados en un microdensitómetro Joyce-Loebl MK-III. Las intensidades de las tres primeras reflexiones ecuatoriales se estimaron por el peso del papel del área correspondiente a cada pico en el registro densitométrico, sin incluir el nivel de fondo. Las intensidades así estimadas, se expresaron en relación a la primera reflexión de cada patrón, a la cual se le asignó arbitrariamente un valor de 100.

Dimensiones del retículo:

El espaciado del retículo se calculó a partir de la posición de la primera reflexión ecuatorial, utilizando la ley de Bragg: $d_{10} = \lambda / 2 \sin \theta$ [d_{10} : separación entre los planos 10 (hk) de un retículo hexagonal; λ : longitud de onda, y θ : ángulo de Bragg]. La distancia de separación entre los centros de dos filamentos de miosina adyacentes (d_m) se calculó a partir de d_{10} :

$$d_m = 2d_{10}/\sqrt{3}$$

El área de la celda unitaria del retículo hexagonal bidimensional se calculó como $A = \sqrt{3/2} d_m^2$

Síntesis de Fourier:

Se hicieron síntesis de Fourier con las intensidades de las tres primeras reflexiones ecuatoriales correspondientes a los patrones de difracción de rayos-X de cada caso (vivo, relajado y rigor). Los módulos de los factores de estructura se calcularon con los valores de intensidad corregidos por el factor de Lorentz:

$$|F_{hk}| = \sqrt{I_{hk} \sqrt{h^2 + k^2 + hk}}$$

donde h y k son los índices de la reflexión. Así, en un retículo hexagonal, a las tres primeras reflexiones le corresponden, respectivamente, los índices 10, 11 y 20. Suponiendo centrosimetría en la estructura transversal del sarcómero, la síntesis de Fourier se calculó^{20,21} como:

$$\rho(x,y) = 1/A \sum_h \sum_k \pm |F_{hk}| \cos 2\pi(hx + ky)$$

Los factores de estructura correspondiente a planos de similar espaciado se consideraron iguales, lo cual impone una simetría rotacional de 3 en las estructuras calculadas, utilizando las tres primeras reflexiones ecuatoriales.

Mapas de Fourier:

Las estructuras calculadas se representaron en gráficos bidimensionales, donde el valor de densidad electrónica se representa en una escala de grises, correspondiendo las zonas más oscuras a las de mayor densidad electrónica.

Todos los cálculos fueron realizados en un computador VAX-11/780 y los mapas de Fourier fueron hechos en una impresora Printronix-MVP, con el apoyo de subrutinas gráficas de impresión de tonos.²⁰

RESULTADOS

Músculo vivo de tarántula:

En la figura 1 se observa la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X de un músculo vivo de tarántula. El espaciado relativo de las dos primeras reflexiones que se observan a ambos lados del pararrayos central dio un valor de $1,73 \pm 0,5$ (Media \pm Desviación estándar, $n = 8$), que es la relación esperada ($\sqrt{3}$) para el patrón de difracción producido por un retículo hexagonal. Para longitudes del sarcómero, entre 5,6 y 8,5 μm , el espaciado del retículo (d_m) varió entre 60 y 48,6 nm, siguiendo una relación en la que se mantiene constante el volumen del retículo:

$$d_m = \frac{1}{\sqrt{5}} \sqrt{\frac{2V}{\sqrt{3}}}$$

tal como se ha descrito en otras preparaciones.⁶

PATRON DE DIFRACCION ECUATORIAL DE UN MUSCULO VIVO DE TARANTULA

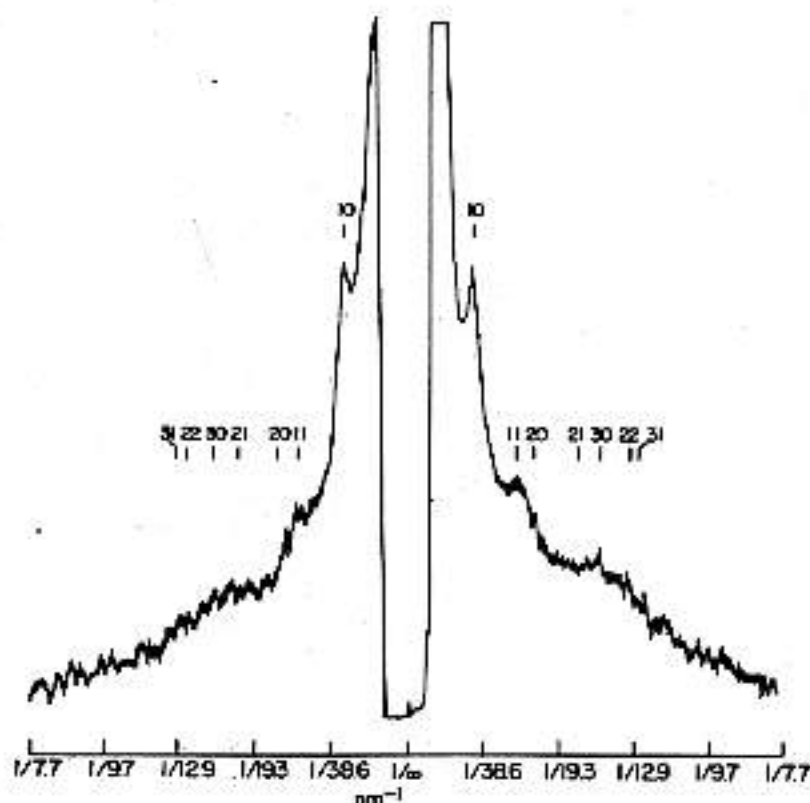


Figura 1. En el eje horizontal se representa la coordenada recíproca en nm^{-1} y en el eje vertical la intensidad de la radiación en unidades arbitrarias. Los números sobre el trazo son los índices (hk) correspondientes a las reflexiones de un retículo bidimensional hexagonal ($t=10^\circ\text{C}$). Tiempo de exposición: 5 horas, aproximadamente.

Músculo de tarántula desmembrado:

En la figura 2 se observan los patrones de difracción de un músculo desmembrado incubado en presencia de las soluciones experimentales (a y c: solución relajadora; b y d: solución rigor) y en la figura 3 se presenta el registro de tensión mecánica correspondiente al músculo incubado en cada solución. Puede apreciarse, claramente, que cuando el músculo

pasa de la solución relajadora (Fig. 2: a y c) a la solución de rigor (Fig. 2: b y d) la intensidad de las reflexiones 11 y 20 aumentan, mientras que la 10 y otras reflexiones de mayor orden (21 y 30) disminuyen. Este cambio que denota una variación importante en la estructura de los miofilamentos, fue acompañado por un incremento en la tensión producida por los músculos (Fig. 3). En los cuatro patrones de difracción de la figura 2 y en el registro de tensión de la figura 3, puede verse que los fenómenos inducidos al cambiar de solución se revierten al volver a la solución previa.

PATRONES DE DIFRACCIÓN ECUATORIAL DE UN MUSCULO DE TARANTULA DESMEMBRADO

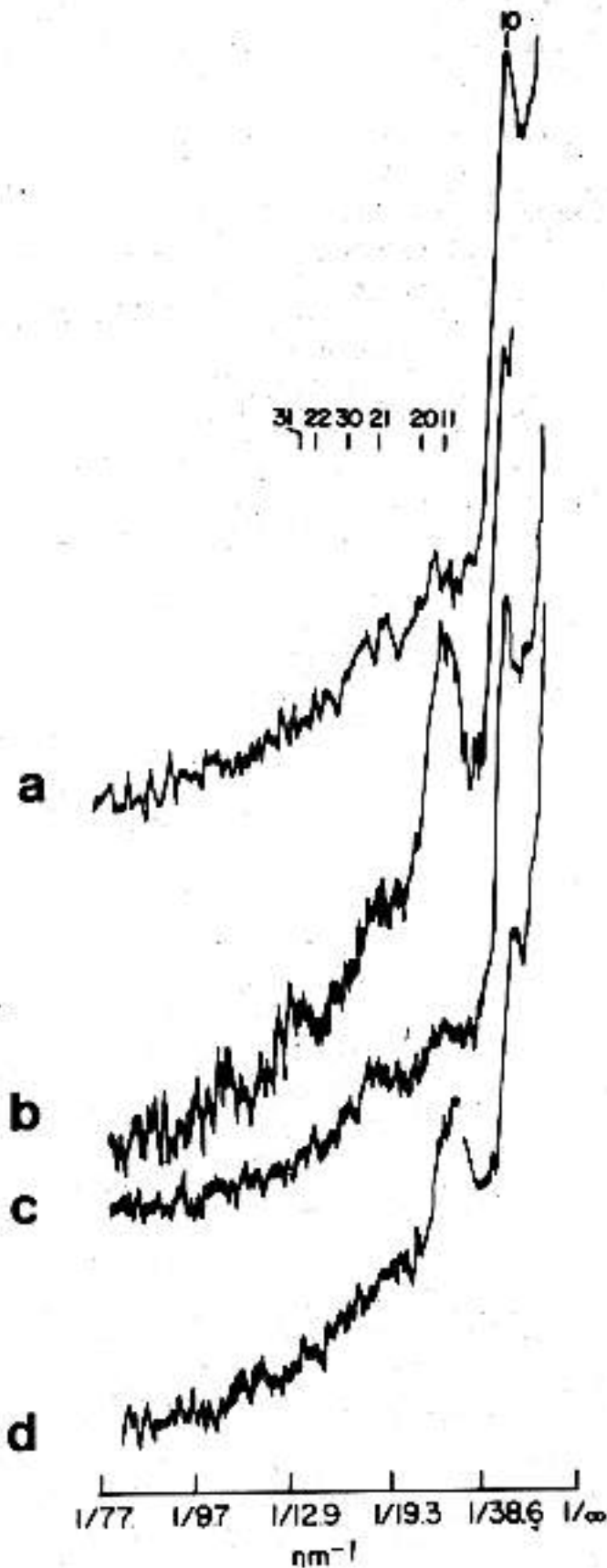


Figura 2. Los trazos de arriba hacia abajo representan cuatro patrones obtenidos del mismo músculo en presencia de: a) solución relajadora; b) solución de rigor; c) solución relajadora; d) solución de rigor. El tiempo de exposición de cada patrón fue de 5 horas, aproximadamente. Las unidades de este gráfico son iguales a las de la figura 1 y para simplificar sólo se presenta una mitad del patrón.

TENSION MECANICA PRODUCIDA POR UN MUSCULO DESMEMBRADO DURANTE UN EXPERIMENTO

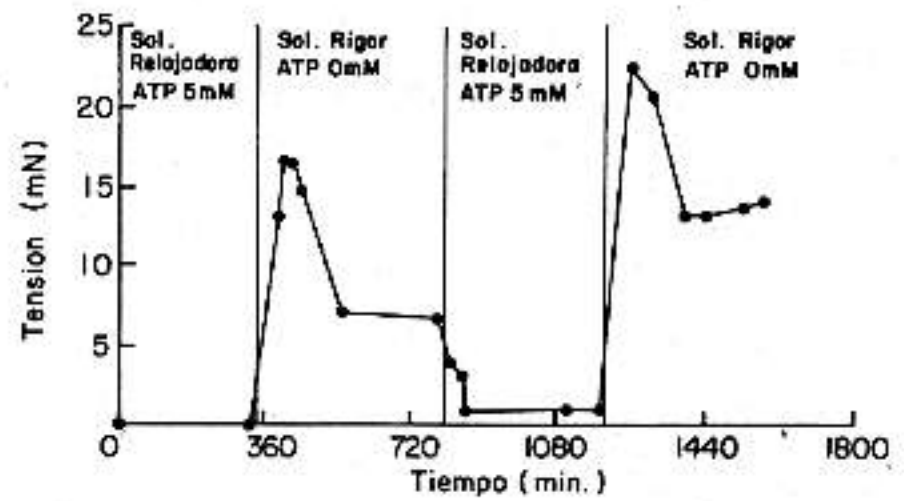


Figura 3. Las líneas verticales representan el momento del cambio de solución.

Características de los patrones de difracción:

En la figura 4 se presenta un gráfico comparativo de las intensidades de las reflexiones presentes en la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X correspondientes a músculos vivos, relajados y en rigor. Puede verse que la relación entre las intensidades de las tres primeras reflexiones, correspondientes a los patrones de músculo vivo y relajado, es $I_{10} > I_{11} \approx I_{20}$. En el patrón de rigor, en cambio, la relación anterior se presenta invertida: $I_{10} < I_{11} \approx I_{20}$. Por otro lado, la similitud entre las intensidades de las reflexiones 11 y 20 es característica de los arreglos de miofilamentos donde se presentan más de 6 filamentos delgados alrededor de cada filamento grueso.^{13,24,25}

El espaciado del retículo (d_m) para los músculos desmembrados relajados o en rigor, fue de $53,9 \pm 1,3$ nm ($n = 8$) y $53,1 \pm 1,6$ nm ($n = 8$), respectivamente.

INTENSIDAD DE LAS TRES PRIMERAS REFLEXIONES ECUATORIALES

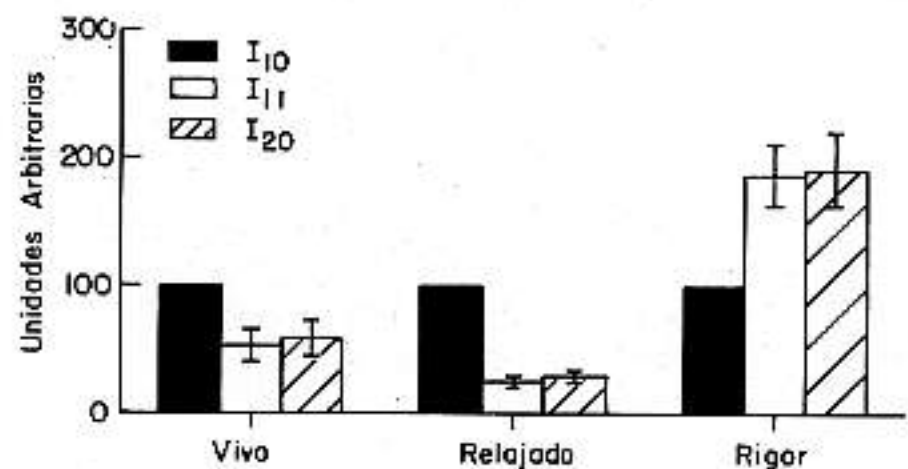


Figura 4. La altura de las barras representa la media: error estándar de los valores de intensidad (músculos vivos: $n=5$; músculos desmembrados: $n=8$) expresados en unidades arbitrarias y asignando el 100 por ciento de intensidad a la reflexión 10 de cada patrón.

Síntesis de Fourier:

A partir de las intensidades de las tres primeras reflexiones se calcularon los módulos de los factores de estructura co-

respondientes (tabla I) y se hicieron las síntesis de Fourier para cada caso, las cuales tienen una resolución de 24 nm aproximadamente. Para resolver el problema de la fase se probaron todas las combinaciones (0 o π) posibles y se compararon las estructuras calculadas con micrografías electrónicas de cortes transversales de los músculos estudiados.^{20,21} De dicha comparación, concluimos que para todos los casos (músculos vivos, relajados y en rigor), la combinación de fases más probable con los tres primeros factores de estructura era 0 0 0, y con ésta se calcularon las estructuras a partir de los datos de la tabla I.

TABLA I

MODULOS DE LOS FACTORES DE ESTRUCTURA*

Condición	F_{10}	F_{11}	F_{20}
Vivo	100	96	108
Relajado	119	76	87
Rigor	61	109	124

* Los factores de estructura de esta tabla fueron calculados a partir de las intensidades promediadas de varios patrones. Los valores están normalizados de tal modo que al hacer la síntesis de Fourier (sin incluir F_{00}) con signo + para los módulos de las tres reflexiones consideradas, todas las estructuras calculadas tienen el mismo valor de densidad electrónica en el punto correspondiente al centro del filamento grueso ($x = 0, y = 0$).

En la figura 5 se presentan los mapas de Fourier de las estructuras calculadas para los músculos vivos (Fig. 5A), relajados (Fig. 5B) y en rigor (Fig. 5C).

MAPAS DE FOURIER

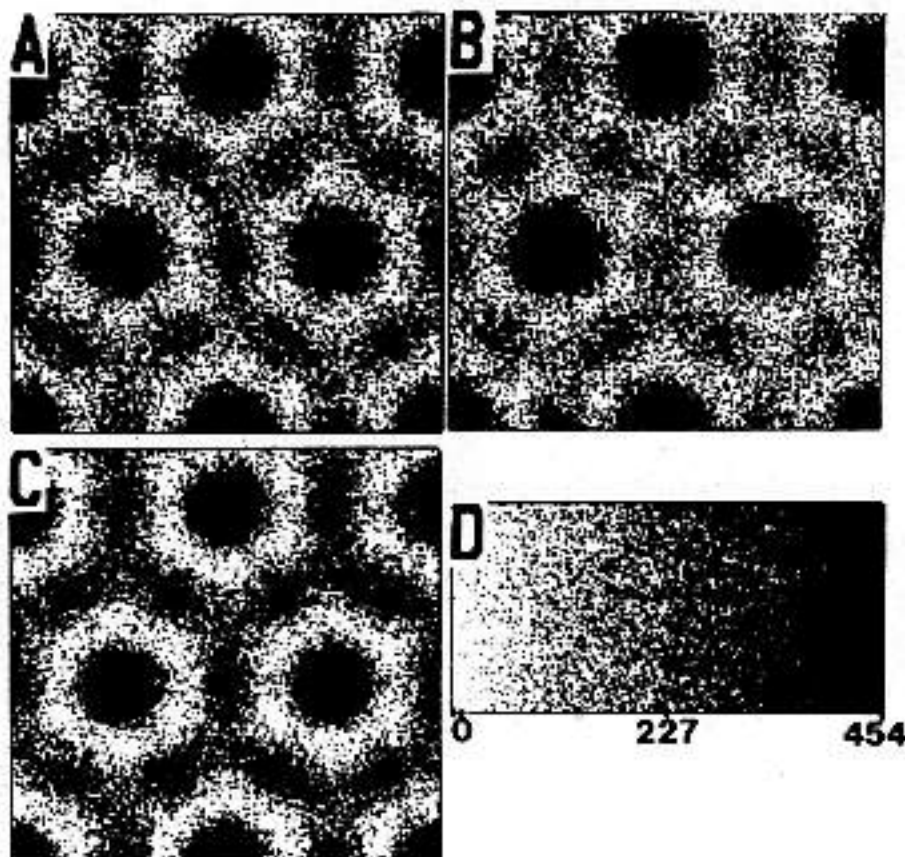


Figura 5. A) músculo vivo, B) músculo desmembrado en solución relajadora y C) músculo desmembrado en solución de rigor. Los mapas fueron calculados con los factores de estructura 10, 11 y 20, obtenidos a partir de los datos de intensidad promedio en cada caso. En D) se representa la escala de tonos utilizada para los tres gráficos.

En estas estructuras pueden verse zonas circulares de densidad electrónica más alta, las cuales pueden ser identificadas como la proyección axial del filamento grueso de miosina. Rodeando a estas zonas se aprecia otra región de alta densidad electrónica, de forma entre circular y hexagonal, que correspondería a la proyección de los filamentos delgados. En comparación con la estructura del músculo vivo (Fig. 5A) y la del músculo relajado (Fig. 5B), en la estructura correspondiente al estado de rigor (Fig. 5C) se observa mayor densidad electrónica en la zona correspondiente a los filamentos delgados y menor densidad en la región inmediatamente alrededor del filamento grueso, lo que indica que ha ocurrido un desplazamiento de masa de los filamentos gruesos hacia los filamentos delgados. Este desplazamiento de masa puede apreciarse, también, en la figura 6, donde se grafica la densidad electrónica a lo largo de los planos 10 (Fig. 6A) y 11 (Fig. 6B).

PERFILES DE DENSIDAD ELECTRONICA

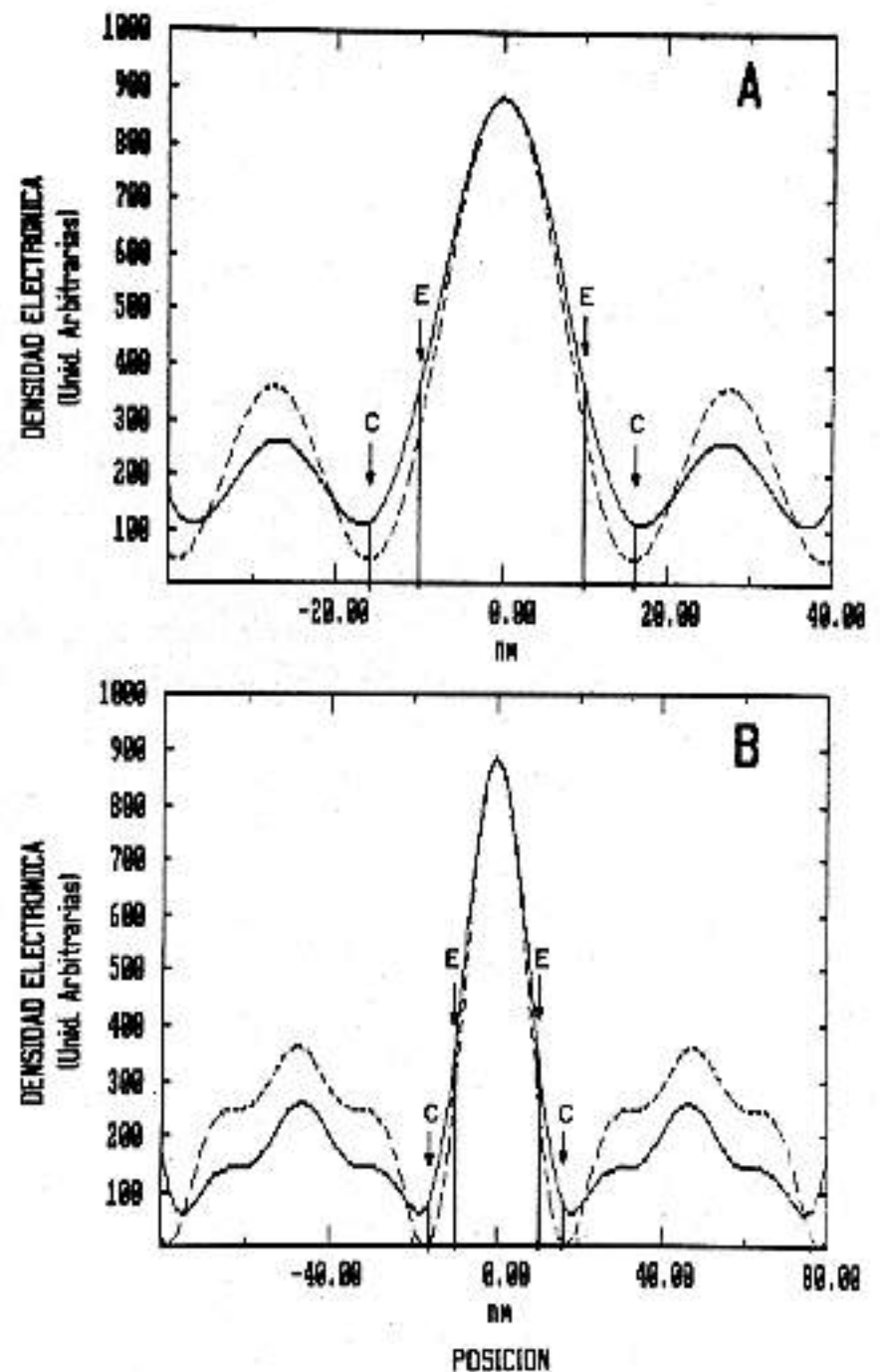


Figura 6. Densidad electrónica (unidades arbitrarias) vs. posición (nm) a lo largo de los planos: A) 10 y B) 11. El punto en 0 nm corresponde al eje central del filamento grueso y las dos líneas verticales, a ambos lados, señalan el radio del esqueleto (E) y el radio externo de la zona de las cabezas de miosina (C) en el estado relajado, según datos de la reconstrucción tridimensional del filamento grueso de tarántula.³

Determinación de la masa desplazada al pasar del estado relajado al estado de rigor:

Para estimar la cantidad de masa que pierde el filamento grueso cuando pasa del estado relajado al estado de rigor, se calculó, para ambos estados, la integral de la densidad electrónica en el círculo que formaría la proyección axial del filamento grueso en el estado relajado:

$$M = \int_D \int \rho(x, y) dx dy \quad (1)$$

donde: $\begin{cases} M = \text{masa electrónica del filamento grueso.} \\ D = \text{Círculo sobre el plano XY que representa el contorno de la proyección axial del filamento grueso.} \end{cases}$

El radio de dicho círculo se fijó en 18 nm, que es el radio promedio alrededor del eje del filamento grueso (origen del espacio real), para el cual la función densidad electrónica del estado relajado se encuentra en un mínimo (ver Fig. 6). Estos cálculos indicaron que el filamento grueso pierde alrededor del 27 por ciento de su masa cuando pasa del estado relajado al estado de rigor.

Determinación del número de cabezas de miosina desplazadas al pasar del estado relajado al estado de rigor:

Para interpretar el valor obtenido en términos de la cantidad de cabezas de miosina que son desplazadas, calculamos la proporción que representan las cabezas de miosina en un filamento grueso de músculo de tarántula, apoyándonos en datos reportados en la literatura (tablas II-A, II-B y III). El número de cabezas de miosina que hay en un filamento grueso de músculo de tarántula se calculó según la expresión:

$$N_C = 2 \cdot N_H \cdot (L_F - L_{ZD}) / S_A \quad (2)$$

donde: $\begin{cases} N_C = \text{Número de cabezas.} \\ L_F = \text{Longitud del filamento.} \\ L_{ZD} = \text{Longitud de la zona desnuda.} \\ S_A = \text{Separación axial entre las coronas.} \\ N_H = \text{Número de hélices en la superficie del filamento.} \end{cases}$

Multiplicando N_C por el peso molecular de la cabeza de miosina (115 K) se obtuvo el peso molecular de todas las cabezas (PM_C). Para calcular el peso molecular del esqueleto del filamento (PM_E) primero calculamos su número de moléculas igualando la cantidad de colas de miosina (N_{cm}) a la mitad del número de cabezas (una molécula de miosina tiene una cola y dos cabezas) y sumando a este valor el número de moléculas de paramiosina (N_p) ($N_p = 0,31 N_{cm}$).⁸ El PM_E se calculó, entonces, multiplicando N_{cm} y N_p por sus respecti-

TABLA II-A

ESTRUCTURA DEL FILAMENTO GRUESO DE TARANTULA

Longitud total	4 μ m
Longitud de la zona desnuda	210 nm
Diámetro del esqueleto	20 nm
Diámetro del esqueleto y las cabezas (en estado relajado)	32 nm
Número de hélices	4
Separación axial entre pares de cabezas	14,5 nm
Relación molar paramiosina/miosina	0,31

Datos tomados de Crowther *et al.* (1985)² y Levine *et al.* (1983)⁸.

TABLA II-B

PESOS MOLECULARES Y DIMENSIONES DE LAS PRINCIPALES MOLECULAS QUE FORMAN EL FILAMENTO GRUESO

<u>Miosina:</u>	
Peso molecular del subfragmento S-1	115 K
Peso molecular de la cola	220 K
Longitud de la cola	150 nm
Diámetro de la cola	2 nm
<u>Paramiosina:</u>	
Peso molecular	200-220 K
Longitud	130 nm
Diámetro	2 nm

Datos recopilados por Squire, 1981.¹⁷

TABLA III

MASA ASOCIADA A LAS CABEZAS Y AL ESQUELETO DEL FILAMENTO GRUESO

Número de pares de cabezas en el filamento	1.046
Peso molecular total de las cabezas	240580 K
Número de colas de miosina	1 046
Número de moléculas de paramiosina	324
Peso molecular del esqueleto del filamento (PM_E)	301457 K
Peso molecular total del filamento (cabezas + esqueleto)	542037 K
Masa asociada a las cabezas	44 %

Datos calculados en base a los datos de las tablas II-A y II-B (ver texto).

vos pesos moleculares y sumando ambos valores ($PM_E = PM_{em} \cdot N_{em} + PM_p \cdot N_p$). El resultado de dicho cálculo fue: $PM_E = 301457$ K, lo que indica que el 44 por ciento de la masa del filamento grueso está asociada a los puentes; esta relación, sin embargo, pudiera ser menor si el esqueleto del filamento contiene otras proteínas además de miosina y paramiosina.

Si comparamos ahora la proporción de masa asociada a los puentes, con el desplazamiento de masa medido en las síntesis de Fourier, se concluye que el 27 por ciento de masa desplazada encontrado representa, al menos, el 61 por ciento de las cabezas de miosina.

DISCUSION

Método de desmembramiento:

El hecho de que se observen cambios mecánicos y estructurales reversibles en los músculos desmembrados, indica que efectivamente se ha eliminado el sarcolema como barrera para los solutos presentes en las soluciones experimentales.

A pesar de que los patrones de difracción de los músculos desmembrados en solución relajadora y los de los músculos vivos fueron relativamente similares, estos últimos presentaron valores de I_{11} e I_{20} ligeramente superiores, lo que se traduce en las estructuras calculadas por síntesis de Fourier, en una mayor cantidad de masa asociada a la región de los filamentos delgados. Esta diferencia puede deberse a varias razones: 1) Como en los músculos vivos no se tiene control del medio intracelular, durante el tiempo de exposición a los rayos-X algunas de las fibras pueden haber entrado en estado de rigor por disminución del nivel de ATP. 2) A que en los músculos desmembrados (relajados) las cabezas de miosina se encuentran más cerca del esqueleto del filamento grueso, debido a diferencias entre la composición de la solución relajadora y la composición del sarcoplasma de los músculos en reposo (vivos). En este sentido, una diferencia importante es la concentración de Ca^{++} subumbral que hay en ambos casos: en la solución relajadora, dicha concentración está por debajo de 10^{-9} M debido a la presencia de EGTA, en el sarcoplasma, en cambio, la concentración de Ca^{++} subumbral puede ser un orden de magnitud superior.

Organización transversal de los miofilamentos:

Los datos de difracción de rayos-X reportados en el presente trabajo, indican que los miofilamentos del músculo flexor *metatarsi longus* de la tarántula, se organizan formando un retículo hexagonal, al igual que en otros músculos estriados. La relación I_{11}/I_{20} , por otro lado, indica la presencia de más de seis filamentos delgados alrededor de uno grueso.^{13,24,25} Mediante microscopía electrónica, de hecho, se ha reportado que en otros músculos de extremidad de tarántula hay de 8 a 12 filamentos delgados rodeando a cada filamento grueso.^{9,17}

Según nuestros datos, el espaciado del retículo varía, en el músculo vivo, entre 60 y 49 nm, dependiendo de la longitud del sarcómero. Suponiendo que los filamentos de actina se localizan alrededor del filamento grueso a una distancia de $d_m/2$, tomando como diámetro del filamento grueso 32 nm a nivel de la zona de puentes³ y tomando como diámetro del filamento delgado 10 nm,⁴ las dimensiones del retículo de miofilamentos del músculo estriado de tarántula obtenidas por nosotros, indican que la distancia entre la superficie de los filamentos delgados y el esqueleto del filamento grueso es de 10 a 15 nm. Si consideramos que la longitud de las cabezas de miosina es de aproximadamente 15 nm,³ concluimos que en muchos casos solamente una inclinación de las cabezas de miosina es suficiente para que éstas interactúen con el filamento delgado (figura 7).

MOVIMIENTO DE LAS CABEZAS DE MIOSINA

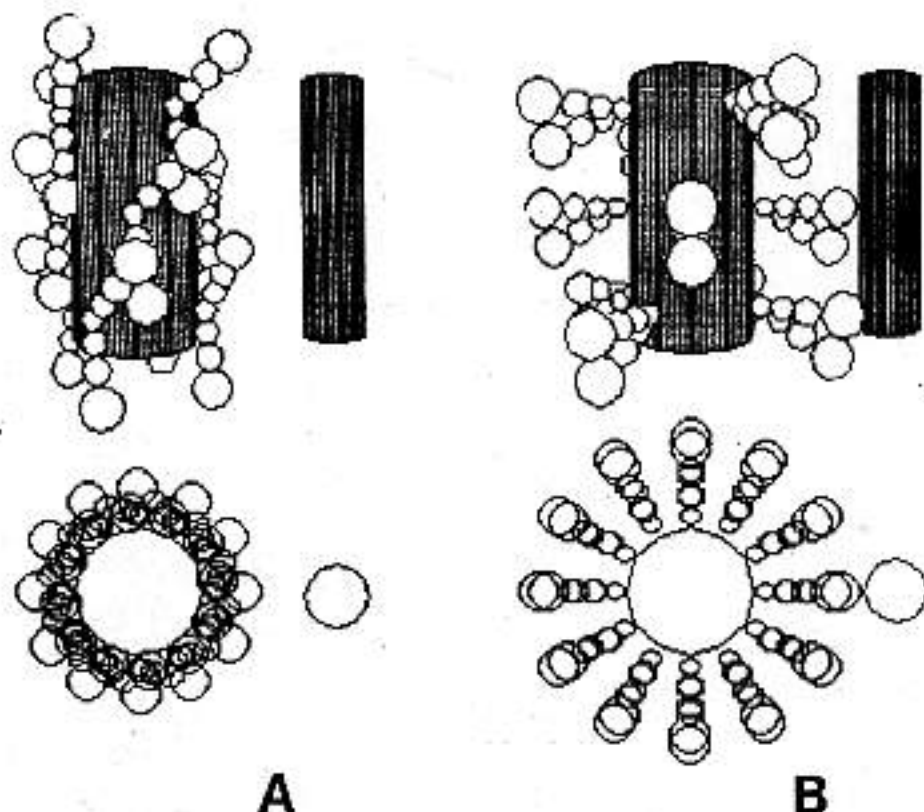


Figura 7. Cada diagrama representa una perspectiva del filamento grueso de músculo de tarántula con un filamento delgado a la derecha (parte superior) y la correspondiente proyección sobre el plano perpendicular al eje del filamento (parte inferior). El diagrama A corresponde a la estructura del filamento grueso de músculo de tarántula propia del estado relajado y el diagrama B a una estructura hipotética, cuando las cabezas de miosina alcanzan al filamento delgado. Estos gráficos se realizaron a escala en la computadora, tomando los siguientes datos de la bibliografía: Radio del esqueleto del filamento grueso = 10 nm.³ Radio del filamento delgado = 5 nm.⁴ Eje largo de la molécula de miosina = 15 nm.^{3, 18} Las dos cabezas de miosina de cada molécula se modelaron como 7 esferas contiguas.¹⁵

En este trabajo se detectó un pequeño incremento en el espaciado del retículo cuando el músculo se transfiere de la solución relajadora a la solución de rigor. Se ha propuesto que la presencia de fuerzas radiales que acompañan la formación de puentes actina-miosina es la responsable de los cambios en las dimensiones del retículo, registrados al inducir, en músculos estriados, estados que impliquen formación de puentes y que, dependiendo de la separación entre los filamentos, estas fuerzas radiales pueden ser compresivas o expansivas.¹² En base a esto, nuestros resultados sugieren que

el espaciado del retículo de los músculos desmembrados ($d_m = 54-56$ nm), está dentro del intervalo donde las fuerzas radiales se vuelven expansivas.

Distribución de masa en los estados de relajamiento y de rigor, determinadas a partir de la síntesis de Fourier:

Las suposiciones de centrosimetría y simetría rotacional ($n = 3$) implícitas en las estructuras calculadas por síntesis de Fourier, deben ser válidas, al menos, a la resolución alcanzada, incluyendo las tres primeras reflexiones (224 nm), ya que no se resuelven detalles (ver Fig. 5) que pudieran alterar las condiciones de simetría mencionadas.

Es de hacer notar la gran similitud existente entre el radio del filamento grueso en el estado relajado, estimado a partir de nuestras síntesis de Fourier (18 nm) y el radio estimado a partir de micrografías electrónicas del filamento grueso de músculo de tarántula (16 nm).³ Sin embargo, diferencias entre ambos valores pueden ser originadas por: 1) Que exista cierto grado de compresión radial en los filamentos preparados para microscopía electrónica. 2) A la dificultad de estimar con precisión la frontera del filamento cuando estos son visualizados por tinción negativa.³ 3) Que en las estructuras calculadas por síntesis de Fourier, los objetos de tamaño similar o inferior al nivel de resolución de la síntesis, aparezcan con dimensiones superiores a las reales.^{26,27}

Comparando las estructuras calculadas para los estados de relajamiento y de rigor, se observó que cuando el músculo pasa de uno a otro estado se produce un desplazamiento de masa del filamento grueso hacia el filamento delgado. Atribuyendo este movimiento de masa a la traslocación de las cabezas de miosina,⁷ nuestros resultados indican que deben participar en él la mayoría de las cabezas (61% al menos). Estimaciones hechas por otros métodos y en otras preparaciones, señalan que la fracción de cabezas de miosina unidas al filamento delgado en el estado de rigor es del 70 por ciento en el músculo fibrilar de insectos¹⁰ y de entre 94 y 100 por ciento en el músculo esquelético de vertebrados.^{1,10,22} Por su

parte, el hecho de que se haya registrado un incremento en la tensión producida por los músculos, indica que las cabezas de miosina, además de desplazarse hacia los filamentos delgados, también interactúan con estos.

Existe evidencia directa de microscopía electrónica, indicadora de que las cabezas de miosina del filamento grueso de músculo de tarántula se encuentran, en el estado relajado, muy cerca del esqueleto del filamento.³ Esto significa que una interacción con el filamento delgado, necesariamente implica un movimiento radial de masa, tal como el detectado en nuestras estructuras calculadas.

El músculo estriado de tarántula es un caso que presenta regulación ubicada en el filamento delgado y en el grueso.⁸ Se ha propuesto que el mecanismo de regulación asociado al filamento grueso funciona debido a un impedimento de las cabezas de miosina a separarse del esqueleto del filamento, cuando las cadenas ligeras de miosina se encuentran desfosforiladas.³ En relación a esta hipótesis, los desplazamientos de masa observados en nuestras estructuras calculadas, junto con los registros de tensión obtenidos, indican que la ausencia de ATP es capaz de liberar a las cabezas de miosina y permitir que éstas interactúen con el filamento delgado para producir tensión. Cabe señalar que en micrografías electrónicas de filamentos gruesos de músculos estriados de tarántula² y de almeja,²³ en las cuales las cabezas de miosina se ven bien ordenadas y cerca del esqueleto del filamento en presencia de ATP, la ausencia de este nucleótido provoca la pérdida de dicha disposición ordenada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el CONICIT, Proyecto S1-1460 (a R. P.) y por la Muscular Dystrophy Association (MDA) de USA (a R. P.). N. P. fue becaria del CONICIT durante la realización del presente trabajo. H. S. fue becario del CEA-IVIC, durante la elaboración de este estudio.

REFERENCIAS

1. Cooke, R. y Franks, K.: "All myosin heads form bounds with actin in rigor rabbit skeletal muscle". *Biochemistry* 19: 2265-2269, 1980.
2. Craig, R. y Padrón, R.: "Structure of tarantula muscle thick filaments". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 3(4): 487, 1982.
3. Crowther, R. A.; Padrón, R. y Craig, R.: "Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle". *J. Mol. Biol.* 184: 429-439, 1985.
4. Egelman, E. H. y Padrón, R.: "X-ray diffraction evidence that actin is a 100 Å filament". *Nature* 307: 56-58, 1984.
5. Haselgrove, J. C.: "Structure of vertebrate striated muscle as determined by X-ray diffraction studies", en "Handbook of Physiology" *Am. Physiol. Soc.* cap 5, pp. 143-170, 1983.
6. Huxley, H. E.: "Investigations of biological structures by X-ray methods. The structure of muscle". Ph.D. Thesis, University of Cambridge. Cambridge, 1952.
7. Huxley, H. E.: "Structural difference between resting and rigor muscle; evidence from intensity changes in the low angle equatorial X-ray diagram". *J. Mol. Biol.* 37: 507-520, 1968.
8. Lehman, W. y Szent-Gyorgyi, A. G.: "Regulation of muscular contraction distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom". *J. Gen. Physiol.* 66: 1-30, 1975.
9. Levine, R. J. C.; Kensler, R. W.; Reedy, M. C.; Hoffmann, W. y King, H.: "Structure and paramyosin content of tarantula muscle thick filaments". *J. Cell Biol.* 97: 186-195, 1983.
10. Lovell, S. J.; Knight, P. J. y Harrington, W. F.: "Fraction of myosin heads bound to thin filaments in rigor fibrils from insect flight and vertebrate muscles". *Nature* 293: 664-666, 1981.
11. Lynn, R. W. y Cohen, G. H.: "Equatorial X-ray reflections and cross arm movement in skeletal muscle". *Nature* 258: 770-772, 1975.
12. Matsubara, I.; Goldman, Y. E. y Simmons, R. M.: "Changes in the lateral filament spacing of skinned muscle fibres when cross-bridges attachment". *J. Mol. Biol.* 173: 15-33, 1984.
13. Millman, B. M. y Bennet, P. M.: "Structure of the cross-striated adductor muscle of the scallop". *J. Mol. Biol.* 103: 439-467, 1976.

14. Padrón, R. y Huxley, H. E.: "The effect of the ATP analogue AMPPNP on the structure of crossbridge in vertebrate skeletal muscles: X-ray diffraction and mechanical studies". *J. Musc. Res. and Cell Mot.* 5: 613-655, 1984.
15. Panté, N.; Sosa, H. y Padrón, R.: "Predicción de cambios relativos en el patrón de difracción ecuatorial de rayos-X causados por la activación de la contracción muscular". *Act. Cient. Venez.* 37(2): 223-225, 1986.
16. Schartau, W. y Leidescher, T.: "Composition of the hemolymph of the tarantula *Urypelmia californicum*". *J. Comp. Physiol.* 152(1): 73-77, 1983.
17. Sherman, R. G. y Luff, A. R.: "Structural features of the tarsal claw muscle of the spider *Urypelmia marxi* Simon". *Canadian J. of Zool.* 49: 1549-1556, 1971.
18. Squire, J. M.: *The Structural Basis of Contraction*. Plenum Press, New York, 1981.
19. Sosa, H.; Panté, N. y Padrón, R.: "Determinación de la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X de músculo vivo de tarántula". *Act. Cient. Venez.* 37(5): 587-588, 1986.
20. Sosa, H.: "Estudio por difracción de rayos-X de la estructura de los filamentos contractiles en músculos estriados de tarántula". Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), 1986.
21. Sosa, H.; Panté, N. y Padrón, R.: "Estructura transversal del sarcómero de músculo desmembrado de tarántula en condiciones de relajamiento o de rigor". *Act. Cient. Venez.* 37, supl. 1: 10, 1986.
22. Thomas, D. D. y Cooke, R.: "Orientation of spin labeled myosin heads in glycerinated fibers". *Biophys. J.* 32: 891-906, 1980.
23. Vibert, P. y Craig, R.: "Structural changes that occur in scallop myosin filaments upon activation". *J. Cell Biol.* 101: 830-837, 1985.
24. Wakabayashi, K. y Namba, K.: "X-ray equatorial analysis of crab striated muscle in the relaxed and rigor states". *Biophys. Chem.* 14: 111-122, 1981.
25. Yagi, N. y Matsubara, I.: "The equatorial X-ray diffraction patterns of crustacean striated muscle". *J. Mol. Biol.* 117: 797-803, 1977.
26. Yu, L. C.; Steven, A. C.; Naylor, G. R. S.; Gamble, R. C. y Podolsky, R. J.: "Distribution of mass in relaxed frog skeletal muscle and its redistribution upon activation". *Biophys. J.* 47: 311-321, 1985.
27. Yu, L. C.: "Effects of limited resolution on intensity maps reconstructed from equatorial X-ray diffraction intensities of skeletal muscle". *Biophys. J.* 51: 472a, 1987.