


Universidad de Sonora

División de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física



Estudio de las Propiedades Mecánicas de la Proteína Titina

Tesis que para obtener el título de
Licenciado en Física
presenta

Rodrigo Arturo Rosas Cabrera

Febrero de 2006

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Dedico este trabajo:

A Yadira, mi compañera y mi fuerza...

*A Pablo, mi músico-hermano, sin él no hubiese
seguido estudiando...*

*A mi Padre, que me dio las herramientas para tolerar
a la ciencia como una fiel amiga...*

*A mi Madre, por ser siempre mi Madre y por
ayudarme con la corrección de este trabajo...*

Agradecimientos:

*Al profesor José Luis Marín, por asesorarme y
aguantarme durante el trabajo...*

*A los profesores Arnulfo Castellanos, Sergio
Gutiérrez, Angelina Uribe, y Laura Yeomans por su
ayuda en mi formación como estudiante y como
persona...*

*A los compañeros que compartieron conmigo las
horas de estudio, las desveladas y la lucha
estudiantil...*

*"La música es el arte más directo, entra por el
oído y va al corazón..."*

Magdalena Martínez.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Introducción | 5 |
| Capítulo 1. La molécula de la proteína Titina | 7 |
| 1.1 ¿Qué es la Titina? | 8 |
| 1.2 Métodos de estudio de la Titina | 9 |
| 1.2.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) | 10 |
| 1.2.2 Pinzas Ópticas (OT) | 11 |
| 1.2.3 Micropipetas | 12 |
| 1.3 Algunas propiedades estructurales de la Titina | 13 |
| Capítulo 2. La Titina y las estructuras en las que participa | 15 |
| 2.1 La Titina y su participación en las Fibras Musculares | 15 |
| 2.1.1 Contribución de la Titina en la velocidad de contracción de las fibras del músculo esquelético | 16 |
| 2.1.2 El tono muscular, otro resultado de las propiedades mecánicas de los filamentos de la Titina | 17 |
| 2.1.3 Las propiedades pasivas de las fibras del músculo esquelético | 19 |
| 2.2 La Titina en el músculo esquelético | 20 |
| 2.2.1 Estructura del músculo esquelético | 21 |
| 2.2.2 Relaciones funcionales fundamentales | 22 |
| 2.2.3 Las propiedades histórico-dependientes del músculo esquelético | 23 |

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 3. Caracterización mecánica de la proteína Titina | 25 |
| 3.1 Relación Fuerza v.s. Longitud | 26 |
| 3.2 Modelos Comparativos y Técnicas de Simulación | 28 |
| 3.2.1 El Modelo de Eslabones Libres | 28 |
| 3.2.2 Modelo de la Cadena de Gusano | 29 |
| 3.2.3 Método de Monte Carlo | 30 |
| 3.2.4 Dinámica Molecular | 32 |
| Conclusiones | 35 |
| Bibliografía | 37 |

Introducción

La historia muestra que la física ha jugado un papel central en el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la estructura y función de la materia biológica, y que lo seguirá jugando. Según el conocimiento actual, es imposible reconstruir el plano arquitectónico completo de formas complejas, partiendo sólo de la información contenida en los genes. En el marco de la biología, para entender una proteína basta con conocer la genética, que es indiscutiblemente compatible con las leyes de la física, pero también hay procesos biológicos que son controlados completamente por las leyes físicas, como la evolución de estructuras biológicas.

Por otro lado, además de los procesos que dependen naturalmente de las leyes físicas, con el conocimiento de las mismas el hombre se ha encargado también de construir bio-materiales, llamados así por su característica imitatoria de los materiales biológicos: más de 10 millones de personas usan anualmente en el mundo sistemas controlados de dispensación de medicamentos que dependen fundamentalmente de polímeros. Es inmediato que debido a la finalidad de su utilización los principales problemas de éstos y otros bio-materiales guarden relación con su bio-compatibilidad, sus propiedades mecánicas y su adaptabilidad. Los progresos actuales en la ciencia de los materiales están posibilitando la mejora de las utilidades clásicas de los mismos, así como el diseño de nuevas aplicaciones. En general, se podrían señalar tres situaciones diferentes: el pasado, con el énfasis en la eliminación de tejidos; el presente, con el objetivo principal de la sustitución de tejidos; y el futuro, con el tema de la regeneración de tejidos.

Con el propósito de ser utilizados para reemplazamiento directo de tejidos o para ingeniería y modificación de tejidos, se están desarrollando materiales compuestos de unidades o bloques de materiales derivados de sustancias biológicamente naturales, incluyendo a los componentes de matriz extracelular (CME) que sirven para modelar y facilitar el funcionamiento de los tejidos. Los CME constituyen una mezcla compleja de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos.

Actualmente, usando la tecnología del ADN recombinante, se pueden crear ya análogos artificiales de los CME. Existe también la posibilidad del diseño y expresión de genes artificiales que conduzcan a la producción de proteínas CME artificiales con propiedades mecánicas a la carta y con funciones adecuadas a su utilización; sin embargo, para poder designar el comportamiento mecánico a una de estas proteínas artificiales, primero debemos comprender el comportamiento de las proteínas naturales.

De ahí el surgimiento de este trabajo, el cual consistirá en una investigación exhaustiva alrededor de las propiedades de una proteína específica: la Titina, cuya participación en la vida a través de sus propiedades mecánicas particulares es muy interesante y entender su comportamiento es de gran utilidad para el desarrollo de la ciencia particularmente la física, la biología, la medicina y sus combinaciones.

El trabajo consta de tres partes primordiales, además de una sección de conclusiones del mismo. En los primeros dos capítulos se describirá a la proteína en sus tres modos naturales más característicos, como lo son: la molécula aislada, su participación en las fibras musculares y su participación en el músculo completo, para posteriormente, en el capítulo tres, hacer hincapié en la descripción mecánica de ésta misma proteína.

Son precisamente las hipótesis que nos hemos planteado, las posibles similitudes que planeamos encontrar en los tres niveles de complejidad de organización de la proteína Titina, es decir, el objetivo de la investigación es el comprender el desenvolvimiento mecánico de la Titina en su ambiente natural y poder encontrar y describir las similitudes en el comportamiento mecánico del músculo esquelético, sus fibras y las moléculas aisladas. Asimismo, otro objetivo fundamental de este documento es hacer hincapié en la gran participación que tiene la física dentro de otras áreas del conocimiento en las cuales es necesaria para la mejor comprensión de ciertos eventos naturales.

Capítulo 1

La molécula de la proteína Titina

Las proteínas son macromoléculas cuyas propiedades son el resultado de la conformación y la secuencia en la que se distribuyen los aminoácidos que las componen y dado que los aminoácidos son monómeros, las proteínas pueden identificarse también como polímeros. Los aminoácidos conforman péptidos cuando son conjuntos menores a 10; oligopéptidos, entre 10 y 50; y cuando son conjuntos mayores a 50, ya se habla de proteínas. Una proteína "normal" contiene entre 200 y 300 aminoácidos.

Cada función de las células es dependiente de las proteínas, entre las cuales podemos mencionar el movimiento de células y organismos (proteínas contráctiles), catálisis y reacciones bioquímicas (realizadas por enzimas que contienen proteínas), la estructura de las células (compuesta en su mayor parte de proteínas), los receptores de hormonas (son proteínas), asimismo las proteínas son los nutrientes esenciales de todos los organismos heterótrofos, por lo cual su estudio es de gran importancia para distintas ciencias y para el conocimiento humano en lo general.

Desde hace más de dos décadas, una gran cantidad de investigaciones comprobaron sorprendentemente, que los músculos estriados de los vertebrados contenían aparte de filamentos gruesos y delgados, un tercer sistema sarcomérico (Figura 1) hecho de proteínas gigantes dentro de las cuales podemos encontrar a la *Titina*. Con estos antecedentes, se iniciaron entonces los trabajos y los intentos por explicar de qué manera participaban estas proteínas en la conformación del músculo.

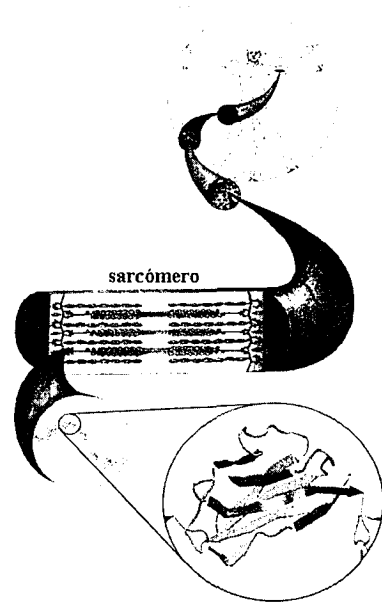


Figura 1. Dominio de inmunoglobulina dentro de una fibra muscular. Imagen tomada y modificada de *The Rude Mechanicals*, Klaus Schulten, junio de 2000¹.

1.1 ¿Qué es la Titina?

La *Titina*, descubierta por Wang y Murayama en 1984 y también conocida como *conectina*, es la proteína más grande entre las conocidas hasta hoy en día, compuesta por alrededor de unos 30 000 aminoácidos. Es también la tercera más abundante y se le puede localizar en el músculo esquelético y en el músculo cardiaco, los cuales forman parte del músculo estriado. Cuando el músculo es estirado, la molécula de la Titina se extiende junto con el sarcómero, proveyéndole de una fuerza pasiva que intenta retraerlo de nuevo a su posición original.

A diferencia de la mayoría de las consideradas proteínas gigantes, la Titina es una proteína conformada por una sola hebra de alrededor de 300 módulos enroscados cada uno como un pequeño resorte molecular; mientras que las demás son regularmente conformadas por distintas proteínas que actúan como componentes de otra nueva. Es entonces la Titina, una proteína mecánica cuyas funciones son de extensión y elasticidad para lograr mantener la integridad de las fibras musculares.

Un diagrama esquemático de la posición de la Titina en el sarcómero se muestra a continuación (Figura 2).

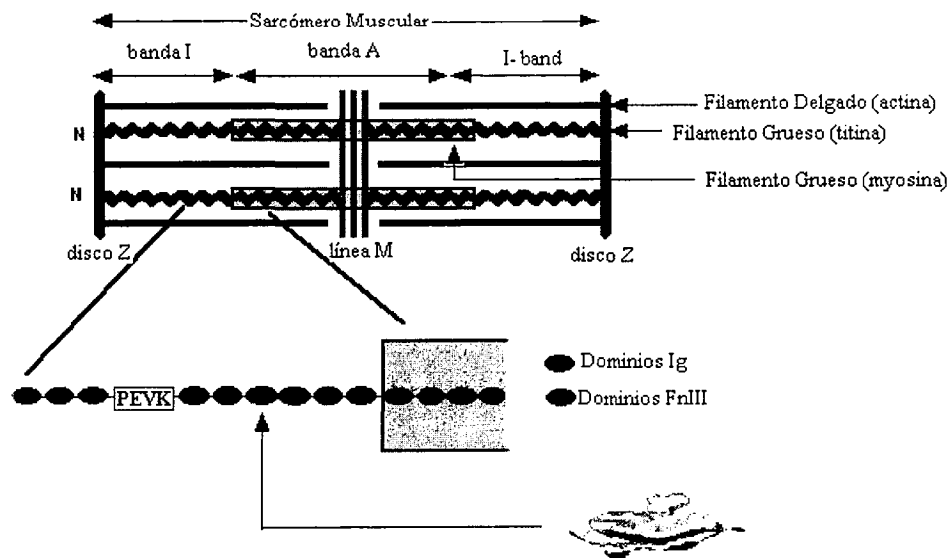


Figura 2. Diagrama que muestra la posición de la Titina en el sarcómero y así mismo un módulo de Ig en la molécula de Titina. Imagen tomada y modificada de *Investigation into design of an elastic muscle protein*. Kathryn Scott. Department of Chemistry-Cambridge Univ².

En el diagrama se observa que la Titina se extiende la distancia entre la línea M y el disco Z, pero sólo la parte correspondiente a la banda I es funcionalmente extensible. Está hecha de dominios Inmunoglobulina (Ig), que son los responsables de la elasticidad del sarcómero cuando no está muy estirado, y Fibronectina tipo III (fnIII) con algunas regiones como el dominio PEVK, que aún siendo menos estructurado, es el responsable de la elasticidad del sarcómero cuando éste se estira considerablemente. La banda I conecta el disco Z y la banda A conecta sólo los dominios de inmunoglobulina.

La banda A de la Titina está compuesta por arreglos regulares de los dominios de Ig y de FnIII que la conectan a otra proteína de nombre *Myosina*, y por lo tanto, no puede ser extendida al aplicársele tensión; la banda I está compuesta desde la punta hasta la cola de dominios de inmunoglobulina, interrumpidos por secuencias de unión mucho menos estructuradas, esta banda puede ser estirada y es la causante de la elasticidad pasiva en los músculos. Todos los dominios de inmunoglobulina están predichos para tener la misma estructura básica que se muestra en la siguiente figura:



Figura 3. Serie de dominios de inmunoglobulina – conformación de la molécula de Titina. Imagen tomada y modificada de *Investigation into design of an elastic muscle protein*. Kathryn Scott. Department of Chemistry-Cambridge Univ. ².

El dominio PEVK es una secuencia que incluye prolina (P), glutamato (E), valina (V) y lisina (K) y que se comporta como una cadena proteínica quasi-desenvuelta, es decir, prácticamente no opone resistencia mientras se desenrolla la Titina.

1.2 Métodos de estudio de la Titina

Para el estudio de esta proteína gigante, se han utilizado diferentes métodos que se han venido desarrollando a lo largo de los años. Estos experimentos son sensibles a fuerzas muy pequeñas y son utilizados para estirar y manipular moléculas aisladas. Entre las que más destacan podemos mencionar la técnica de AFM (*Atomic Force Microscopy*) para la cual se utiliza el microscopio de fuerza atómica, la OT (*Optical*

Tweezers o Pinzas Ópticas, las Pinzas Magnéticas, la técnica de Micropipetas, entre otras.

Estas técnicas se utilizan con el mismo principio, que consiste en estirar las moléculas, de tal manera que se puedan medir las fuerzas que se emplean y también las deformaciones que están sufriendo las proteínas.

En los años recientes, las características mecánicas de la Titina han sido determinadas de varias maneras: en miofibrillas, donde la mayor parte de la elasticidad se deriva de la Titina y en la cual anticuerpos con etiquetas fluorescentes o doradas han sido usados para observar una elongación entre diferentes regiones de la molécula; y en moléculas aisladas usando OT o AFM.

1.2.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El Microscopio de Fuerza Atómica es un microscopio de sonda de barrido, en donde la sonda es una afilada punta de metal que puede tener un grosor de un solo átomo en su extremo, este microscopio tiene una gran ventaja, ya que puede utilizarse en materiales no conductores, característica de la cual carece el microscopio de túnel de barrido que es otro de los principales microscopios de sonda de barrido. A medida que la sonda de estos microscopios se mueve sobre la muestra que se somete a análisis, los electrones de la sonda de metal son repelidos por las nubes electrónicas de la muestra. La altura de la sonda es ajustada automáticamente, de tal manera que siempre se reciba una fuerza constante.

Uno de los ejemplos más espectaculares de la aplicación del microscopio de fuerza atómica en su modalidad de espectroscopia de fuerza es el estudio de las propiedades mecánicas de ciertas proteínas, esto consiste en fijar una molécula aislada por sus extremos y estirla controladamente para medir fuerzas resultantes.

Sin embargo, aún con esta técnica, la forma exacta del desdoblamiento de las moléculas no puede obtenerse directamente del experimento. No obstante, una vez identificados los aspectos más relevantes del proceso aquélla puede simularse con ayuda de las computadoras.

Los experimentos que se han realizado con la Titina mediante el del empleo del microscopio de fuerza atómica, han arrojado resultados que nos muestran que comparada con proteínas que no tienen un desempeño mecánico, ésta requiere una fuerza considerable para desdoblarse su molécula. Sin embargo sí se puede desdoblarse, dibujando en este proceso un patrón parecido al de dientes de sierra (Figura 4) para la fuerza que es aplicada, esto es, la fuerza va en aumento hasta que uno de los módulos se estira por completo, y de nuevo empieza a aumentar la fuerza hasta desdoblarse el siguiente módulo. Para evitar problemas con la homogeneidad de los módulos, en el proceso de la AFM, se crean artificialmente proteínas aisladas para tener copias múltiples de dominios de inmunoglobulina del sistema muscular cardíaco humano, por ejemplo.

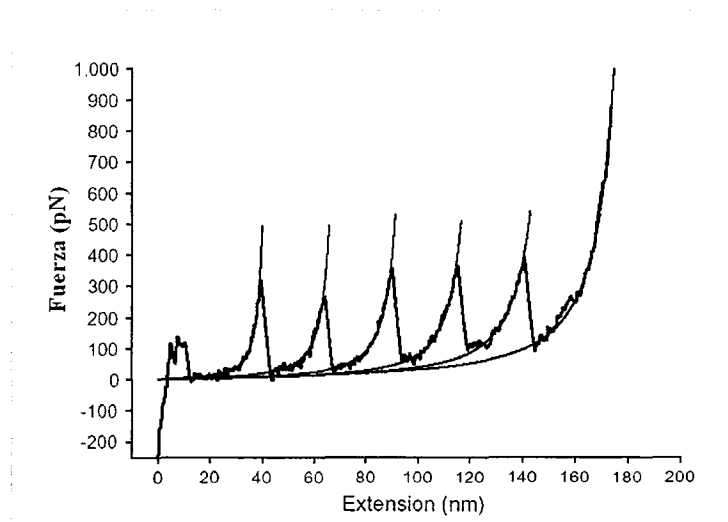


Figura 4. Curva Fuerza-Extensión para la poli-proteína I27_y-K6P. Tomada y Modificada de *Mechanical unfolding intermediates in titin modules*, Piotr E. Marszalek y otros. *Letters to nature* 1999³.

1.2.2 Pinzas Ópticas (OT)

Estos dispositivos consisten en trampas de luz, es decir, son rayos de luz láser que se utilizan para tomar y manipular objetos microscópicos, como células individuales vivas, sin siquiera tocarlas físicamente. Actualmente, la longitud de onda de los rayos no es mucho más corta que un micrómetro.

En el caso del estudio de las propiedades mecánicas de las proteínas, las pinzas ópticas tienen mucha relevancia, dado que debido a sus dos funciones principales: las pinzas ópticas son transductores de fuerza y manipuladores, esto es, permiten mover en el espacio una muestra y asimismo aplicarle una fuerza; pueden tomar una molécula de una proteína o al menos un conjunto de ellas de sus extremos y ejercer una fuerza que permita el desenvolvimiento de los módulos que la componen.

En comparación con el Microscopio de Fuerza Atómica, el rango de fuerzas de las Pinzas Ópticas es mucho más bajo, lo cual representa una gran ventaja, por lo que los resultados para los experimentos que se pueden realizar sobre una misma muestra con ambas técnicas serán mucho más finos para las OT.

1.2.3 Micropipetas

Estos instrumentos son tubos de vidrio sumamente delgados (del orden de micrómetros) y el proceso utilizado para el análisis de proteínas es muy similar al del AFM. La molécula o el filamento que se está estudiando es unido al extremo libre de la micropipeta, ejerciéndole una fuerza al mover el otro extremo de la misma en una dirección predeterminada. Esta fuerza que es generada sobre la molécula, es medida en función del corrimiento en la micropipeta, es decir, en función de la constante de rigidez de la micropipeta.

En el caso particular de la medición de la elasticidad de la Titina, este método ha sido utilizado por distintos investigadores, como es el caso de Keller Mayer y Granzier ⁴ (en 1996) quienes llevaron a cabo un arreglo experimental, en el cual los filamentos de Actina etiquetados fluorescentemente y que limitaban y se adherían a las moléculas de Titina, fijadas a una superficie de vidrio, fueron manipulados con una micropipeta. Además, siguiendo la posición de los filamentos de Actina con ayuda de un microscopio, pudieron observar la naturaleza elástica y el reculado de la molécula de Titina.

1.3 Algunas propiedades estructurales de la Titina

Con los experimentos realizados a través de los diferentes procesos que se han desarrollado para el estudio de la Titina, se ha logrado tener una descripción amplia de la misma, así como también se sigue desarrollando cada vez más la investigación entorno a sus diferentes propiedades.

Retomando lo mencionado en la sección 1.2.1 acerca del desdoblamiento de la molécula de la Titina, ésta presenta mayor resistencia al estiramiento, comparada con las proteínas que no tienen funciones de extensibilidad. La Titina está conformada entonces, como también ya se dijo, por una serie de módulos de inmunoglobulina (Ig) y fibronectina (FnIII) de los cuales particularmente los de inmunoglobulina tipo I27 son aquellos que se van desdoblado a medida que se va aplicando fuerza, es decir, a medida que se va estirando la molécula. Lo anterior lo podemos observar en el patrón de dientes de sierra (figura 3) que se obtiene de los estudios a través de AFM, ya que el espacio entre los picos de fuerza embona muy bien con la magnitud de un dominio I27 perfectamente desenvuelto.

También a través de los experimentos que se han realizado con la AFM se ha mostrado una situación de pre-estiramiento, que consiste en la aplicación de una fuerza relativamente débil -cerca de 50 pN- en la cual el I27 se extiende cerca de 5Å, posteriormente con más fuerza -cerca de 100pN- se extiende alrededor de 15Å, pero la fuerza necesaria para desdoblarlo los cerca de 300Å que alcanza, es de aproximadamente unos 200pN (Schulten, 2000) ⁵. Con este experimento se comprueba la afirmación de que los dominios I27 presentan una protección estructural contra el desdoblamiento.

Cuando una célula del músculo estirado es inactivada, una fuerza pasiva es desarrollada para reestablecer el músculo en su longitud normal. Si la célula es expuesta a una serie de repeticiones de contracción-relajación, las fuerzas registradas durante el estiramiento cambian a medida que el sarcómero empieza a aumentar su longitud, lo cual nos indica que con el tiempo la célula se va desgastando hasta que queda mecánicamente inservible. Ahora, cuando el músculo relajado es estirado rápidamente, la fuerza pasiva decae en función del tiempo en un proceso denominado relajación

muscular. Los procesos dependientes del tiempo y su significancia en el comportamiento del músculo estriado aún no han sido comprendidos del todo, pero se conoce que uno de los principales contribuyentes de la fuerza pasiva de los músculos son los filamentos intersarcoméricos de la Titina, es decir, los filamentos gruesos y los delgados. Es posible que el desgaste mecánico se relacione con la cinética de los dominios, es decir, su desenvolvimiento y su reenvolvimiento, suponiendo que después de un cierto número de repeticiones contracción-relajación habrá un número creciente de dominios que no logrará contraerse de nuevo y es así cuando se considera que la Titina ha alcanzado la fatiga, y es esto lo que produce la distrofia mecánica de la célula muscular.

Capítulo 2

La Titina y las estructuras en las que participa

El músculo esquelético está formado de fibras musculares, denominadas así por su elevada relación longitud-sección. En los mamíferos, la inervación del músculo esquelético es mononeural, es decir, una fibra es inervada por una neurona, pero una neurona puede inervar varias fibras. Es cierto también que una neurona está en contacto siempre con el mismo tipo de fibras, por lo cual podemos definir la relación neurona-fibra como unidad motora. Así las diferentes unidades motoras que componen a un músculo pueden activarse de forma independiente, consiguiendo así la regulación de la intensidad de la contracción.

En la actualidad, nuevas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas han permitido corroborar lo que se había observado por técnicas de Microscopía, esto es, las fibras de los músculos esqueléticos de vertebrados son heterogéneas en su velocidad de contracción.

2.1 La Titina y su participación en las Fibras Musculares

El resultado en un corte transversal de un músculo, es un mosaico de fibras rápidas y lentas. Sin embargo, sí hay mamíferos que poseen músculos compuestos casi en su totalidad de fibras de un solo tipo. Las diferencias entre los distintos tipos de fibras son tanto metabólicas, como fisiológicas. Ambas, en su conjunto proporcionan a cada una las características necesarias para realizar bien su función.

Podemos clasificar a las fibras según su capacidad contráctil: aquellas de contracción lenta (**CL**) o “*slow -twitch*” y las de contracción rápida (**CR**) o “*fast-twitch*”. Las fibras CR se clasifican a su vez en aquellas de contracción rápida tipo **a** (CRa) y las de contracción rápida tipo **b** (CRb).

Las fibras CL (oxidativas lentas) tienen una velocidad de contracción lenta (umbral de estímulo para alcanzar la tensión máxima de 110ms) y están especializadas para actividad continua, presentando una alta resistencia a la fatiga, lo cual significa que estas fibras pueden mantenerse funcionando sin llegar al límite en que puedan generar o mantener la tensión muscular, esto se ocasiona dependiendo de la duración y la intensidad de la actividad contráctil y se ve influenciado también por el mecanismo aerobio o anaerobio del individuo. Particularmente, las fibras CL están construidas para metabolismo aeróbico y utilizan lípidos como fuente de energía. Por otro lado las fibras CRa (glucolíticas oxidativas rápidas) tienen una velocidad de contracción rápida (umbral de estímulo para alcanzar la tensión máxima de 50ms) y son progresivamente requeridas cuando un esfuerzo adicional es necesario, pero siguen siendo resistentes a la fatiga. Éstas están diseñadas para utilizar tanto lípidos como glucosa como fuentes de energía. Por último, las fibras CRb (glucolíticas rápidas) son también de contracción rápida pero muy propensas a la fatiga y están diseñadas para utilizar como energía a la glucosa.

Las fibras, como unidades básicas del músculo, tienen la capacidad de generar fuerzas direccionales cuando son activadas. Los sarcómeros se encuentran alineados en las fibras musculares y trabajan conjuntamente, de tal manera que cuando el músculo se contrae se crea una tensión a lo largo de los ejes de las diferentes fibras que lo conforman.

Estas unidades básicas, son excepcionales y son multinucleadas. Una fibra típica contiene cientos o miles de myonúcleos, que regulan cada uno la forma genética de cierta porción de la fibra que los rodea. A excepción de ciertas proteínas especializadas con las funciones motoras, la distribución proteica es relativamente uniforme a lo largo de las fibras.

2.1.1 Contribución de la Titina en la velocidad de contracción en las fibras del músculo esquelético

La velocidad máxima de acortamiento sarcomérico es un parámetro muy útil para estimar la función contráctil de las fibras musculares. Este parámetro puede ser obtenido experimentalmente a través de la extrapolación de las curvas fuerza-velocidad

hacia el punto fuerza igual a cero. En experimentos como éstos, se debe tomar cuidado especial al tratar de evitar la gran influencia de la tensión pasiva o de reposo en la velocidad de acortamiento ya que a diferencia de un resorte, las estructuras no contráctiles pueden acelerar la velocidad de acortamiento de manera significativa.

Muchos experimentos han demostrado el efecto de la tensión pasiva en la velocidad de acortamiento, incluso antes de que el origen de esta tensión de reposo en los músculos esqueléticos de los vertebrados fuese establecido. Hoy en día se sabe a ciencia cierta que este origen se encuentra en los filamentos intersarcoméricos de titina.

Para determinar la velocidad de acortamiento “pasiva” de una fibra en reposo, puede medirse, en lugar de medir la fuerza durante el experimento, las longitudes de sarcómeros aislados en una fibra seleccionada, grabando el proceso con una cámara.

Los resultados de experimentos como éstos, en los que además se analizan las reacciones que se tienen si se aplican ciertos reactivos que inhiben o degradan a la titina en los sarcómeros, arrojan diferentes resultados para cada caso, es decir, casos en los que la titina está intacta, casos en los que está degradada en mayor o menor intensidad, entre otros.

Así, la Titina es entonces la que mantiene los filamentos delgados centrados en el sarcómero durante la activación, provee un cuadro estructural para otras proteínas sarcoméricas, y funciona como el resorte molecular responsable por el desarrollo de una fuerza retroactiva sobre el estiramiento del músculo o activo.

2.1.2 El tono muscular, otro resultado de las propiedades mecánicas de los filamentos de la Titina

El tono muscular mantiene la postura del cuerpo de los vertebrados, y crea una tensión de respaldo en movimientos activos (Vain, 1996) ⁶. Es ya bien sabido que el mantenimiento del tono muscular consume muy poca energía. Este hecho contradice al mecanismo de contracción del músculo esquelético de Huxley, de acuerdo a éste, la generación de energía mecánica en el sarcómero toma lugar en los puentes que se conectan a los filamentos de actina que a su vez se deslizan entre los filamentos de

miosina durante el proceso. Si el tono muscular fuese resultado del proceso anterior, no quedaría energía para mantener el tono muscular.

En publicaciones recientes, muchos científicos han coincidido en que el músculo esquelético no puede ser tratado como compuesto de dos tipos de fibrillas o el sarcómero por dos tipos de filamentos (actina y miosina), pero sí por tres: actina, miosina y titina. Todos los experimentos de contracción muscular, indican que ni la miosina ni la actina sufren cambios en su longitud durante los procesos, pero la titina es considerada la proteína elástica del sarcómero ya que ésta sí cambia su longitud en el proceso.

Aceptando la hipótesis de Huxley, del deslizamiento de los filamentos en el proceso de contracción muscular, se ha podido asignar a los filamentos de titina el rol de elasticidad pasiva, el mismo asignado a las fibras de colágeno en el *endomysium*, que envuelve cada fibra muscular individual, o en el *perimysium*, envolviendo cada conjunto de fibras musculares.

Algunos datos experimentales nos llevan a la conclusión de que los filamentos de titina cruzan la línea M del sarcómero y cuando el estiramiento mecánico en el *endo-*, *peri-* y *epimysium* se desarrolla, entendemos que los filamentos de titina se arreglan unos con otros y entonces la longitud en estado de reposo del sarcómero está determinada por los filamentos de la titina.

También podemos concluir que las mediciones del tono muscular implican el determinar el estiramiento mecánico de las envolturas musculares y la habilidad para disipar energía del músculo completo. Esto significa que si los músculos tienen buenas propiedades elásticas en los niveles de estiramiento tónico, entonces el componente elástico de las fibras y de los filamentos de la titina toma parte en el proceso de mantenimiento del tono muscular. Pero en caso de que la elasticidad disminuya, es posible que el movimiento de las cabezas de la titina en relación con otros, incrementen la habilidad del músculo para disipar la energía mecánica de elasticidad.

2.1.3 Las propiedades pasivas de las fibras del músculo esquelético

Las propiedades pasivas de las fibras del músculo esquelético recaen directamente en las propiedades de la Titina. Las bases moleculares de esta proteína y su comportamiento, proveen el conocimiento necesario para entender el comportamiento de los filamentos de su misma composición, aún más allá, esta proteína elástica parece contribuir a la estabilidad estructural y mecánica durante la activación por calcio. La titina mantiene los filamentos delgados en una posición centrada dentro del sarcómero, lo que evita el mal funcionamiento del sarcómero en este proceso.

El procedimiento para entender las propiedades mecánicas de una fibra, es el estiramiento de la misma hasta su límite elástico. Para determinar modificaciones en la banda A, las fibras se someten a una depolimerización de los filamentos delgados utilizando altas concentraciones de KCl.

Algunos resultados obtenidos por experimentación con fibras aisladas del músculo esquelético de ratas Wistar son, por ejemplo, la relación proporcional que existe entre el estiramiento de una fibra aislada con el de cada uno de los sarcómeros que la conforman, esto lo podemos observar en la siguiente figura.

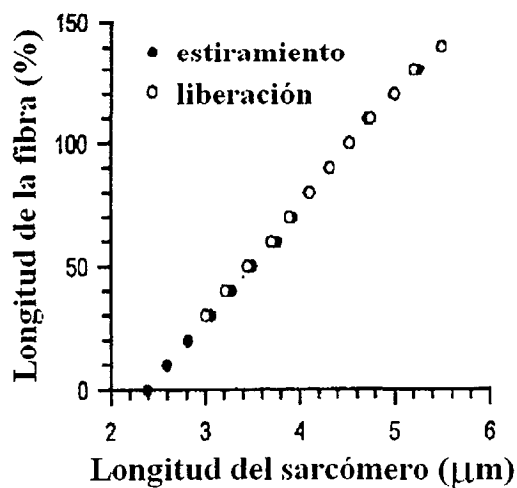


Figura 5. La figura muestra la relación lineal que existe entre la longitud sarcométrica y la fibrosa. Fue tomada y modificada de *Passive Tension of rat skeletal muscle fibers: effects of unloading conditions*. Henk Granzier y otros. *Journal of Applied Physiology* 2002 ⁷.

Otro resultado es también la similitud que existe en la tensión pasiva que presentan de igual manera las fibras y los sarcómeros, con lo cual podemos interpretar que existe una estrecha relación entre ambos niveles de asociación de la titina, es decir, el sarcomérico y el fibroso.

2.2 La Titina en el Músculo Esquelético

Muchas tareas motoras cotidianas, involucran movimientos voluntarios precisos y permanencia en posiciones incómodas o difíciles. Estas tareas son ejecutadas y reguladas por nuestro sistema nervioso central. Una de las más arduas tareas para este sistema, es la de compensar los esfuerzos que deben hacer una u otra extremidad para adoptar cierta posición específica, es decir, medir la cantidad de fuerza que debe de aplicarse para no exagerar un movimiento.

Es bien sabido que los mecanismos compensadores de esfuerzo necesitan recibir directamente la información de receptores periféricos, como lo son los nervios o sensores eléctricos musculares y los órganos tendilíneos de Golgi, que detectan cambios en la longitud del músculo esquelético y tensión. Esta información concerniente a los cambios de esfuerzo coincide toda en el sistema nervioso central, el cual modifica los comandos motores que llegarán de regreso a los generadores de fuerza en los mismos músculos esqueléticos.

Los cambios en los esfuerzos en contracciones voluntarias pueden incrementar la resistencia muscular pasiva, que puede percibirse como endurecimiento de estos músculos (*tensión*). Empíricamente es sabido que este endurecimiento puede ser disminuido a través de procesos de estiramiento y asimismo que aumenta con la inactividad. Aparentemente, el cambio en el esfuerzo en el caso de contracciones voluntarias varía dependiendo de las condiciones del músculo en un tiempo inmediato anterior. Ésta es una manifestación de las propiedades histórico-dependientes que presenta el músculo esquelético.

El músculo esquelético relajado, posee de ese modo cierto grado de tensión de reposo a ciertas longitudes. Durante la elongación exhibe una rigidez pasiva, por ejemplo el aumento en la tensión a medida que es estirado.

La tixotropía del músculo esquelético, es decir, su *transformación inducida* arroja que la rigidez muscular y la tensión pasiva de reposo de los músculos depende de una forma importante de los movimientos y contracciones anteriores. Se cree que la rigidez a corto rango provee al sistema músculo esquelético de una estabilidad inherente en contra de perturbaciones menores en las extremidades.

Desde el punto de vista de la ingeniería, el músculo esquelético es una máquina de movimiento. Las proteínas contráctiles se encuentran arregladas en una red con un alto sentido de orden y los tejidos conectivos forman una matriz bien organizada que apoya a la maquinaria contráctil. Ambas partes se acoplan para integrar el músculo completo como una máquina efectiva. Si una fuerza externa es aplicada sobre esta máquina, las propiedades mecánicas pasivas se dejan ver y vuelven a la normalidad cuando esta fuerza deja de ser aplicada. Estas propiedades mecánicas logran desarrollar una tensión activa que le da al músculo la habilidad de tolerar el stress mecánico.

2.2.1 Estructura del músculo esquelético

El músculo esquelético comprende el tejido más largo de nuestro cuerpo y es uno solo, pero está altamente seccionado. Cada una de estas secciones está compuesta por células aisladas o fibras implantadas en una matriz de colágeno. En los límites de la estructura de las secciones musculares, la matriz se vuelve el tendón que lo conecta con el hueso (Figura 6).

A nivel microscópico, el músculo estriado carece de una organización detallada, a diferencia de la gran arquitectura que existe a nivel macroscópico, característica que además es fundamental para el desarrollo de las propiedades mecánicas funcionales que presenta. El efecto funcional de la arquitectura de los músculos puede quedar simplemente expresado de la siguiente manera: la fuerza muscular es proporcional a la fisiología de la sección transversal, y la velocidad muscular es proporcional a la longitud de las fibras musculares.

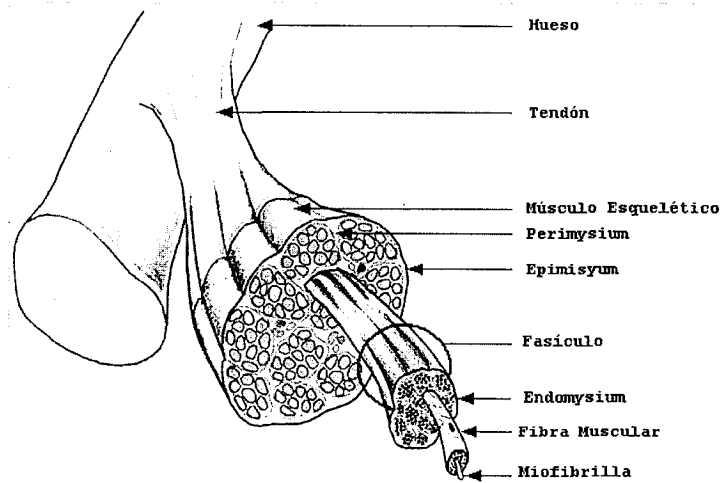


Figura 6. En esta figura se esquematiza la estructura muscular, incluyendo al hueso y al tendón. Fue tomada del artículo *The Structure of the muscle (and associated connective tissues)*. http://www.ivy-rose.co.uk/Topics/Muscle_Structure.htm⁸

2.2.2 Relaciones funcionales fundamentales

Después de analizar la estructura del músculo esquelético, encontramos que para su caracterización debemos considerar fundamentalmente dos relaciones particulares que son:

i) Relación Longitud-Tensión. La curva isométrica de la relación longitud-tensión representa la fuerza que el músculo es capaz de generar mientras se mantiene estirado ha longitudes discretas (Lieber, 1999)⁹. Cuando la tensión en cada una de esas longitudes es graficada contra la longitud, se obtiene una relación como la que se muestra en la siguiente figura.

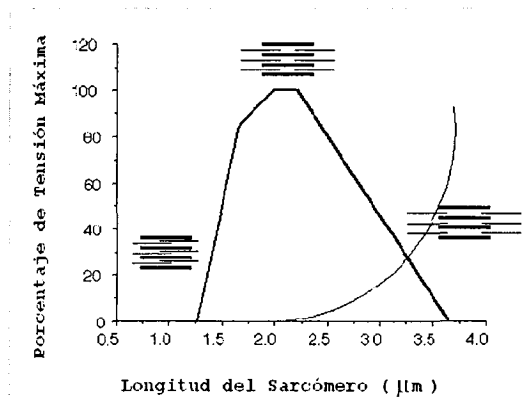


Figura 7. Esta figura muestra la relación sarcomérica longitud tensión, mostrando la fuerza activa (línea gruesa) y la fuerza pasiva (línea delgada) desarrolladas por los sarcómeros. Tomada y modificada de *Skeletal Muscle is a Biological Example of a Linear Electro-Active Actuator*, Richard L. Lieber, marzo 1999⁹.

ii) Relación Fuerza-Velocidad. La fuerza generada por el músculo es función de su velocidad. Históricamente esta relación ha sido utilizada para definir las propiedades dinámicas de los puentes que se crean entre las fibras en los ciclos que se llevan a cabo durante la contracción. Esta relación también es una curva que representa el resultado de muchos experimentos en la misma gráfica y se muestra en la figura 8.

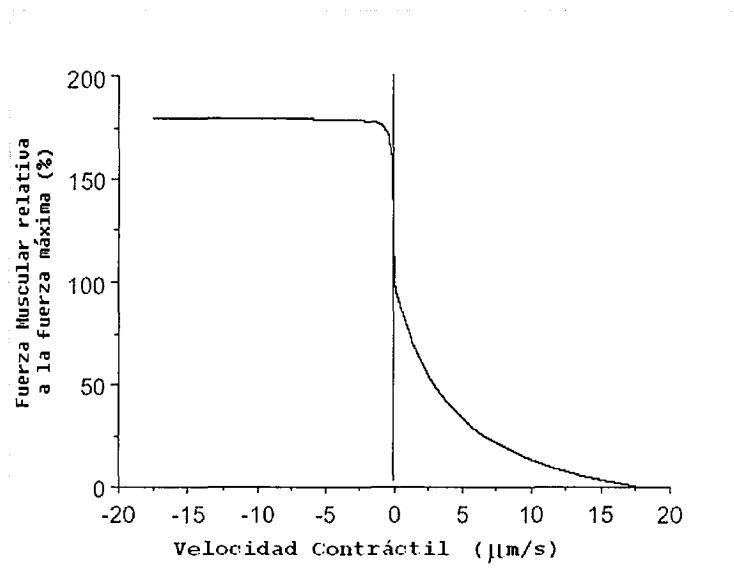


Figura 8. Esta figura muestra la relación sarcomérica fuerza velocidad, representando la fuerza relativa a la fuerza máxima vs la velocidad relativa a la velocidad máxima. Tomada y modificada de *Skeletal Muscle is a Biological Example of a Linear Electro-Active Actuator*, Richard L. Lieber. marzo 1999⁹.

Esta curva es un resultado de muchos experimentos dibujados en la misma gráfica. En el eje horizontal encontramos la velocidad muscular relativa a la velocidad máxima, mientras que en el vertical la fuerza relativa a la fuerza máxima.

2.2.3 Las propiedades histórico-dependientes del músculo esquelético

Los músculos esqueléticos son rígidos para movimientos delicados o pequeños. Cuando éstos son estirados, la tensión aumenta de una manera repentina durante los primeros nanómetros y mucho menos abruptamente conforme aumenta la elongación. Este comportamiento no lineal es característico tanto para el músculo relajado como para el que presenta una contracción activa de sus fibras y se ha atribuido al

estiramiento y a los arreglos cíclicos subsecuentes entre los filamentos de actina y miosina (Campbell & Moss, 2002) ¹⁰.

Estas propiedades no lineales dependen de la historia del movimiento, por ejemplo, si un músculo es estirado dos veces, la fase inicial de la segunda respuesta de contracción depende del intervalo de tiempo entre ambas. Es decir, cuando el intervalo temporal entre las dos contracciones es muy pequeño, la segunda respuesta de contracción es reducida, y cuando el intervalo es largo, las dos respuestas son casi idénticas.

Este comportamiento histórico-dependiente fue descrito primeramente en 1929 por Ernst Denny-Brown, atribuido a un efecto tixotrópico; sin embargo, el mecanismo no ha sido establecido por completo. Mutungi y Ranatunga sugieren que el efecto se ve reflejado en las propiedades mecánicas de los filamentos de titina después de impuesta una contracción y esta conjetura es reforzada por Kellermayer y Minajeva ¹¹, que en el 2000 y 2001 reportaron que la rigidez de los filamentos de la titina disminuye en movimientos lentos, sin embargo aún existen dudas al respecto.

Capítulo 3

Caracterización mecánica de la Titina

Como se mencionó en el Capítulo 1, la titina ha sido estudiada a través de distintas técnicas con las cuales se ha ido abundando, entre otras cosas, en la caracterización mecánica de esta proteína gigante.

La idea de que la titina sea una molécula elástica fue sugerida casi inmediatamente después de su descubrimiento. La fenomenología de la extensibilidad de la titina ha sido descrita en una larga serie de experimentos los cuales la han identificado como un resorte con multi-estados cuyos segmentos se extienden a los diferentes niveles de estiramiento sarcomérico. Para ello no ha sido suficiente la caracterización a través de observaciones microscópicamente inmuno-eléctricas que sólo proveen imágenes estáticas y no datos para la fuerza, por lo que se han hecho mediciones también con métodos inmuno-fluorescentes en combinación con mediciones de fuerza.

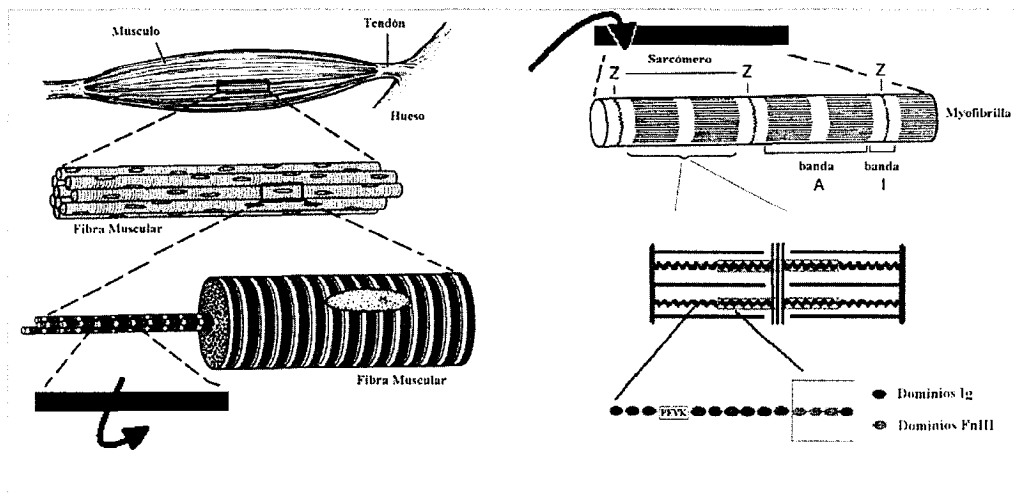


Figura 9. Jerarquía organizacional del músculo esquelético. Tomada y modificada de *Skeletal Muscle Fibre Types*, James J. Sciote, 2000¹².

3.1 Relación Fuerza v.s. Longitud

Uno de los aspectos que podemos analizar en lo que respecta a esta caracterización es el relacionado con los resultados obtenidos para las relaciones fuerza v.s. longitud de la molécula de la titina (en el caso de AFM), en este caso las gráficas son corregidas por varios factores, como es el caso de la obtención de las curvas fuerza v.s. longitud molecular de extremo a extremo (end-to-end), en las cuales se introduce al menos el factor longitud - cero, dato obtenido para la fuerza-cero que corresponde a la fuerza de respuesta en el momento en que la punta de la sonda del microscopio alcanza la superficie del sustrato (Kellermayer et al, 2003) ¹³. A continuación se presentan dos gráficas de las cuales se pueden abstraer ciertos datos importantes:

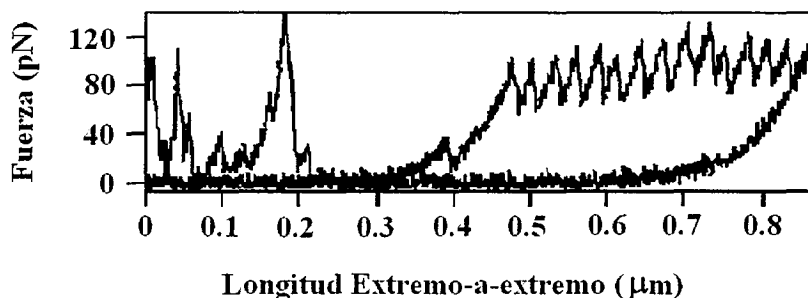


Figura 10. Gráfica de Fuerza vs Longitud extremo-a-extremo para una molécula aislada de Titina en la cual aparecen picos igualmente separados. Tomada y modificada de *Mechanics and structure of Titin oligomers explored with AFM*. Miklós S.Z. Kellermayer y otros, marzo 2003 ¹³.

En esta primera figura (Figura 10) particularmente en la sección correspondiente a los picos y que se refiere al estiramiento, podemos observar la forma en que varía la fuerza con el cambio en la longitud extremo a extremo de la membrana, advirtiendo además que el espacio entre cada pico de fuerza es el mismo. Otro dato en el cual podemos hacer hincapié, es acerca de la forma de la gráfica que está superpuesta y en sentido contrario, la cual se refiere a la contracción donde aparentemente no se presentan picos.

Por otro lado podemos observar en la Figura 11 en la cual aparecen varias mediciones hechas con AFM, cómo independientemente de que la fuerza sea mayor el comportamiento de los picos de fuerza se mantiene, pero existe un número mayor de picos en menos tiempo.

Las flechas en esta segunda gráfica indican si estamos en el proceso de estiramiento (hacia la esquina superior derecha) o de reenvolvimiento (hacia la esquina inferior izquierda).

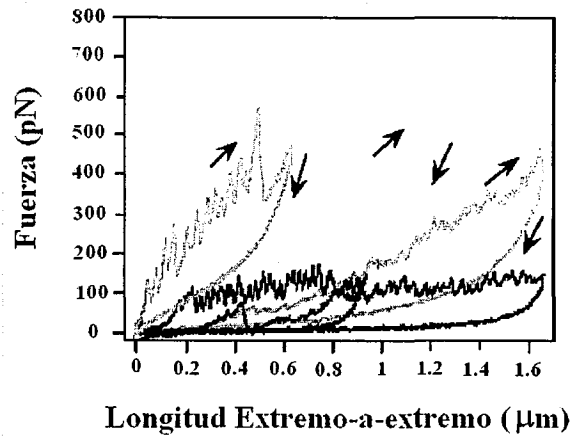


Figura 11. Curvas representativas de Fuerza vs Longitud extremo a extremo durante el estiramiento y redoblamiento de la titina. Tomada y modificada de *Mechanics and structure of Titin oligomers explored with AFM*. Miklós S.Z. Kellermayer y otros, marzo 2003 ¹³.

Este análisis en los resultados anteriores es el que nos permite asegurar analíticamente que los picos de fuerza igualmente espaciados que observamos son consecuencia de la composición modular de la proteína titina, es decir, que la fuerza va en aumento hasta que un módulo se desdobra por completo y posteriormente empieza a elevarse de nuevo con otro de los módulos, siguiendo así hasta que se desdobl原因 todos en la molécula. La siguiente figura es una muy buena representación de lo anterior:

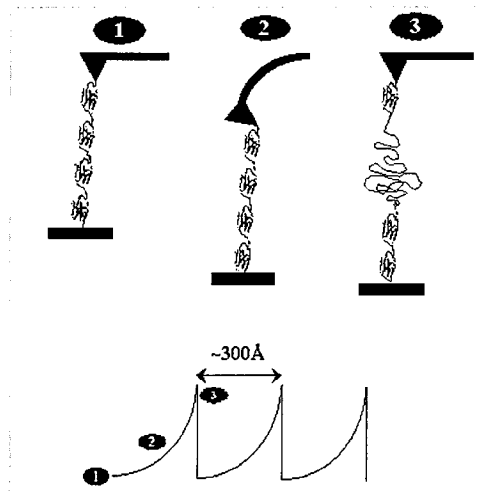


Figura 12. En esta figura se muestra el desdoblamiento de uno de los módulos de una molécula de titina con AFM y su representación en la gráfica de dientes de sierra. Imagen tomada y modificada de *Investigation into design of an elastic muscle protein*. Kathryn Scott. Department of Chemistry-Cambridge Univ. ²)

3.2 Modelos Comparativos y Técnicas de Simulación

Debido a las características de los procesos experimentales que han sido utilizados en el estudio de la Titina y las dificultades que se han presentado para su interpretación, se ha recurrido mucho a la simulación computacional y, por otra parte, también se han realizado modelaciones matemáticas que complementan los resultados que se han obtenido de dichos experimentos.

3.2.1 Modelo de Eslabones Libres

El modelo de la Cadena de Eslabones Libres o FJC (Freely Jointed Chain) hace referencia a una cadena de monómeros con una longitud de enlace fija y arreglada. En este modelo, los enlaces químicos son libres de rotar y la cadena posee una distribución uniforme de ángulos de enlace. La distancia extremo-a-extremo está definida por el vector-cadena $r = \sum_{i=1}^n L_i$, ésta es la suma sobre todos los vectores de enlace (L_i),

donde $n + 1$ es el número de enlaces en la cadena (Bemis, 1998) ¹⁴.

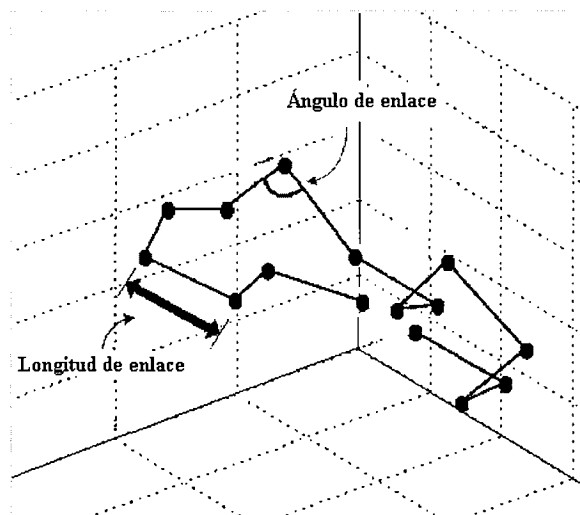


Figura 13. Representación gráfica del modelo FJC. Tomada y modificada de *Single Polymer Chain Stretching*, Jason E. Bemis. University of Pittsburgh 1998 ¹⁴.

La fuerza entrópica de extensión uniaxial se describe por el inverso de la función de Langevin $\mathfrak{L}(R) = \text{Coth}(R) - \frac{1}{R}$, siendo R el radio de extensión, es decir, la fracción de longitud de contorno que se extiende el polímero.

La fuerza queda expresada por:

$$f = \frac{kT}{A_K} \mathfrak{S}^*(R),$$

donde A_K es una constante particular del modelo que se llama constante de Kuhn.

3.2.2 Modelo de la Cadena de Gusano

Siendo más realista que el FJC para muchos sistemas, el WLC (Worm Like Chain) o modelo de la Cadena de Gusano asume que los ángulos de enlace están arreglados en $\sim 180^\circ$, pero siguen siendo libres de rotar. Es utilizado y creado para el análisis de la elasticidad entrópica¹ de los polímeros semiflexibles, que empata perfectamente con el comportamiento polimérico de las proteínas.

La restricción que presentan los ángulos de enlace para este modelo, crea condiciones distintas para las características de ambos modelos. La fuerza de extensión por ejemplo para este modelo queda expresada como:

$$f = \frac{kT}{q} \left[\frac{1}{4(1-R)^2} - \frac{1}{4} + R \right],$$

donde q es la longitud de persistencia y se refiere esencialmente a que tan lejos se extiende el polímero en una dirección dada antes de empezar a cambiar de dirección aleatoriamente.

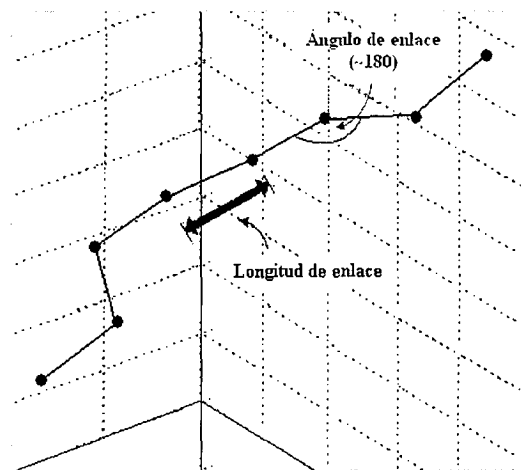


Figura 13. Representación gráfica del modelo WLC. Tomada y modificada de *Single Polymer Chain Stretching*, Jason E. Bemis. University of Pittsburgh 1998¹⁴.

¹ Característica de una goma elástica, es decir, cuando ésta puede estirarse varias veces su longitud sin romperse después de aplicarle una tensión y recuperar su forma inicial a dejar de aplicarla.

3.2.3 Método de Monte Carlo

Bajo el nombre de "Método de Monte Carlo" o "Simulación de Monte Carlo", se agrupan una serie de procedimientos que analizan distribuciones de variables aleatorias y su simulación con números aleatorios. Éste método puede dar solución a muchos problemas matemáticos con experimentos basados en muestreos estadísticos por computadora. A veces la aplicación del método de Monte Carlo se usa para analizar problemas que no tienen un componente aleatorio explícito; en estos casos un parámetro determinista del problema se expresa como una distribución aleatoria.

Un ejemplo muy claro de este problema es por ejemplo un "tiro al blanco" dividido en dos o más secciones, en el que se quiere saber las probabilidades de que el dardo caiga en una u otra sección. Una manera de analizar el experimento es la de repetir muchas veces un lanzamiento y registrar en donde pegó el dardo. Una vez registrados los resultados de un número grande de repeticiones sabremos por las anotaciones cual es la densidad de probabilidad de que haya pegado o no en alguna de las secciones del "tiro al blanco".

El desdoblamiento de un dominio Ig requiere el rompimiento de seis puentes de hidrógeno (*Schulten et al, 2001*)⁵ y para el modelaje de un solo dominio, asumimos que cada uno de los seis puentes puede ser descrito como una doble pared de potencial; las dos paredes representan el puente intacto, y roto. Las constantes de ruptura y redoblamiento están dadas por:

$$k_b(f) = \nu \exp \frac{-U_b(f)}{k_B T} \quad k_r(f) = \nu \exp \frac{-U_r(f)}{k_B T}$$

donde $U_b(f)$ y $U_r(f)$ son las barreras dependientes de la fuerza f para la ruptura y el desdoblamiento (*Makarov et al, 2002*)¹⁵. El método de Monte Carlo genera los eventos de ruptura y formación con las probabilidades proporcionales a las constantes que se muestran anteriormente. El dominio de Ig se rompe tan pronto como el último de los puentes de hidrógeno lo haga también. Si el número de puentes intactos en el dominio de Ig es n , entonces $n(t)$ es una corrida aleatoria en la que el dominio se rompe cuando n llega a cero.

La fuerza inducida para desdoblarse una molécula de Titina de N dominios Ig se simula con un procedimiento como el que sigue: Primero definimos $\sigma(t)$ como la probabilidad de que un dominio no se desdoble al tiempo t . Entonces para una cadena de N dominios, la probabilidad de que no se desdoble es: $S(t) = \sigma(t)^N$ y la distribución de probabilidad para el tiempo de desdoblamiento es: $p(t)dt = -S'(t)dt = -N\sigma(t)^{N-1}\sigma'(t)dt$.

Es suficiente conocer $\sigma(t)$ para simular la molécula completa de Titina. Una de las implicaciones importantes que la ecuación anterior arroja es que la distribución temporal de desdoblamiento, y por ende, la distribución de la fuerza de desdoblamiento dependen del número de dominios existentes.

En la siguiente gráfica, se muestra la distribución de la probabilidad de la fuerza de estiramiento para una velocidad de estiramiento de $1\mu\text{m/s}$ para dominios Ig, resultado comparable con uno de los picos de la Figura 4 del patrón dientes de sierra.

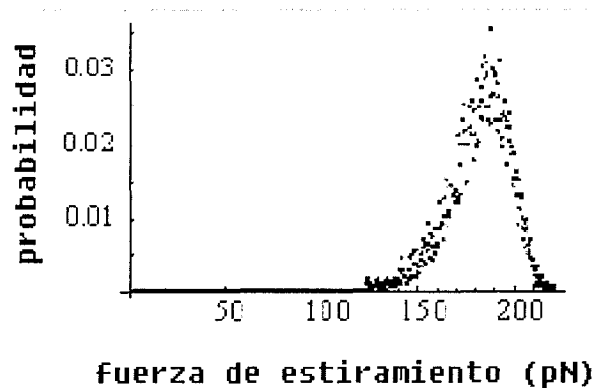


Figura 15. Distribución de la fuerza de desdoblamiento para dominios Ig. Tomada y modificada de *Kinetic Monte Carlo simulations of protein folding and unfolding*, D. E. Makarov. University of California, 2002¹⁵.

El método de Monte Carlo no es del todo confiable, a continuación se muestra una gráfica de la dependencia que tiene la fuerza de desdoblamiento con la velocidad con la que se tira de la proteína.

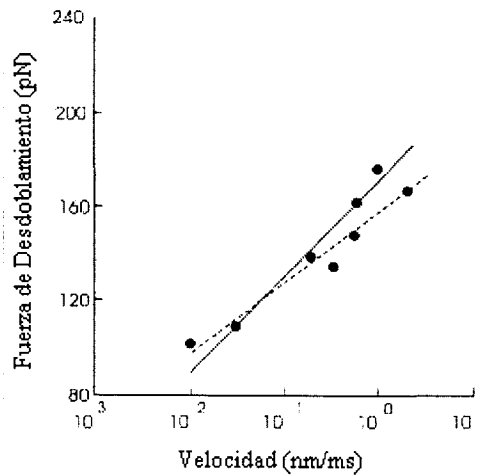


Figura 16. Dependencia de la fuerza de desdoblamiento con la velocidad. Tomada y modificada de *Folding-unfolding of FNIII domains in tenascin: an elastically coupled two state system*, J. L. Marin y otros. *Journal of Biomechanics*, 2002¹⁶.

En esta gráfica podemos apreciar que el resultado experimental (línea continua) y la simulación de Monte Carlo (línea punteada) no se corresponden para cualesquier velocidad. Por lo que la utilización de éste método no es exacta y su aplicación dependerá de las características particulares de la situación que se esté estudiando.

3.2.4 Dinámica Molecular

La dinámica molecular es una técnica de simulación computacional que permite, para problemas como el estudio del desdoblamiento de una molécula, el considerar algorítmicamente todas las fuerzas atómicas involucradas y obtener de ellas el movimiento de cada uno de los átomos por integración numérica de las ecuaciones de Newton.

Con ayuda de este esquema y aunado a la espectroscopía de fuerza atómica ya ha sido posible realizar avances considerables en la comprensión de fenómenos como la identificación molecular, que entre otras cosas permite explicar la forma en que el sistema inmunológico detecta cuerpos extraños y los combate. En lo que a nuestro problema se refiere, este proceso híbrido experimento-simulación participa también en el estudio de las propiedades elásticas de biomoléculas, por ejemplo en el estudio del cómo las células musculares deformadas recuperen su forma original, como es el caso de la titina.

La simulación con dinámica molecular (SMD) describe a las moléculas como un arreglo de átomos con coordenadas conocidas, masa, carga, tipo de enlace, entre otras. El movimiento se simula en una serie de pasos reproduciendo detalladamente el nivel atómico de los movimientos moleculares. En cada uno de estos pasos, una serie de cálculos son realizados, entre los cuales destacan, el cálculo de las interacciones de enlace, la nueva posición de cada uno de los átomos y posteriormente las fuerzas son calculadas nuevamente.

En la siguiente figura, se muestra uno de los resultados de una SMD para un módulo de inmunoglobulina I27 con una velocidad de estiramiento de 0.5 Armstrongs por picosegundo. En la gráfica podemos distinguir, entre otras cosas, la fuerza de estiramiento cuando la cadena ya está completamente extendida en la región IV.

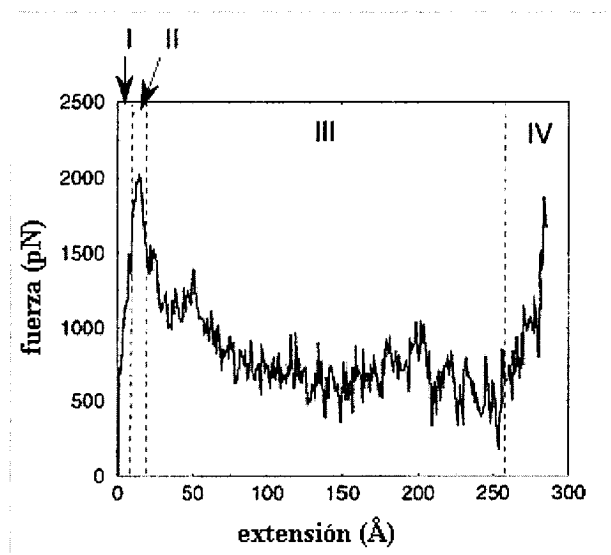


Figura 17. Perfil fuerza-extensión con SMD para dominios Ig. Tomada y modificada de *Unfolding of Titin Immunoglobulin Domains by Steered Molecular Dynamics Simulation*, Hui Lu y otros. *Biophysical Journal*, 1999¹⁷.

Podemos entender mejor a qué se refieren las regiones si observamos también la figura 18 que SE presenta a continuación. En ellas se presentan dibujos de los estados intermedios de simulaciones de desdoblamiento: **a** (región I, 10Å de extensión), **b** (región II, con 17Å de extensión), **c** (región III, con 150Å de extensión) y **d** (la región IV, con el dominio extendido completamente y una longitud de 285Å).

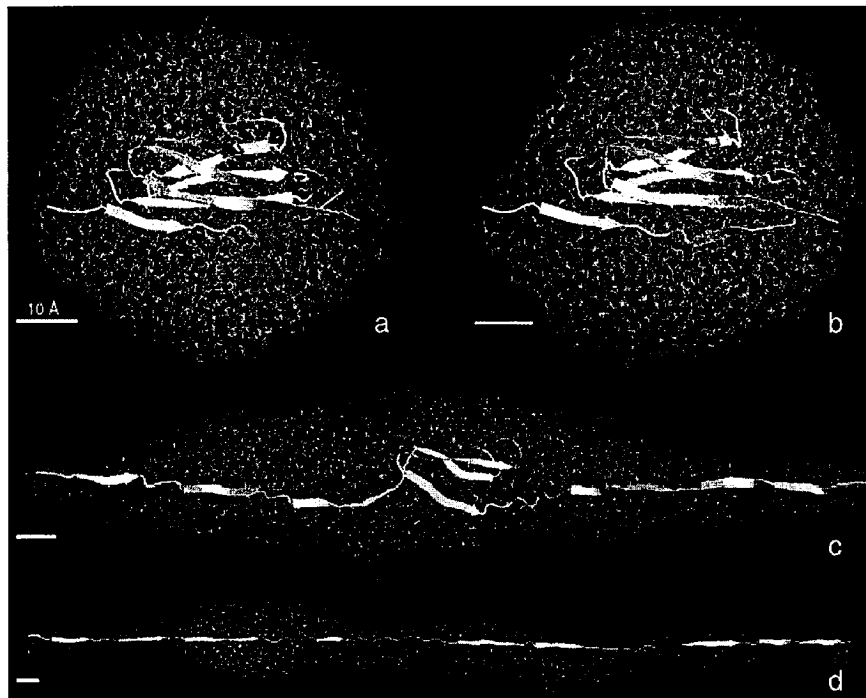


Figura 18. Estados intermedios de una simulación de estiramiento de un dominio Ig. Tomada y modificada de *Unfolding of Titin Immunoglobulin Domains by Steered Molecular Dynamics Simulation*, Hui Lu y otros. *Biophysical Journal*, 1999¹⁷.

Por último podemos mencionar que en la actualidad existen diversos tipos de software que comparten las bases y algoritmos de la técnica de dinámica molecular, entre los cuales podemos mencionar al Not (just) Another Molecular Dynamics program (NAMD), o bien al Visual Molecular Dynamics (VMD) como los más novedosos y cuyas necesidades de cómputo son saciadas por clústers de alrededor de 86 procesadores con plataformas de Windows o Linux.

Conclusiones

Después de la revisión del material que fue seleccionado para el desarrollo del tema que se discute en el presente trabajo, uno de los puntos que no pudo pasar desapercibido, es precisamente el papel que juega la física en la investigación fisiológica que existe en torno a la naturaleza de los organismos complejos en los que participan las proteínas elásticas y de la importancia que tiene el estudio de la misma para el desarrollo de la ciencia biomédica, biofísica y físico-médica. La física es entonces una ciencia que siempre estará presente en el desarrollo interdisciplinario del conocimiento humano que es trascendentemente necesario para la comprensión de los procesos naturales que afectan directamente el desarrollo de la humanidad, razón por la cual se vuelve indispensable.

El desarrollo de los distintos métodos experimentales, de simulación computacional y mixtos, que no pudieran existir sin la acumulación de conocimiento científico son también el resultado de años de evolución de las teorías físicas y del conocimiento acumulado a cerca de las distintas áreas de la naturaleza. Estos métodos, como pudimos observar, son tan especializados como el avance científico-tecnológico lo permita y su aplicación en el estudio de las propiedades mecánicas de la titina, en sus distintas formas de organización, es inminente. Entiéndase con lo anterior, que es tan importante el estudio del tema que seleccionamos así como el desarrollo que mejore las técnicas cómputo-experimentales que nos permitirán, por supuesto, tener cada vez más facilidad y mayor certeza de que las cosas que estudiamos son como las describimos.

En lo referente al tema central del trabajo, pudimos observar y entender que el comportamiento de una proteína elástica, y en particular, el de la proteína titina, se basa primordialmente en dos aspectos. Primero, que es una proteína modular y por lo tanto la reacción que presenta a la aplicación de una fuerza de estiramiento es por ciclos, es decir, se observa como es que se van desdoblado los módulos uno por uno. Segundo, que tiene la característica de regresar a su posición original al dejar de aplicarle la fuerza mientras no alcance la fatiga.

Otra cosa que se hizo evidente durante la investigación, fue el hecho de que en los distintos niveles de organización de la titina, llámese molécula, fibra o músculo completo, existe un comportamiento muy similar al que se menciona en el párrafo anterior y congruentemente coincide con la idea de que las moléculas de titina se acomodan de una manera específica para formar las fibras y los músculos, y que son las mismas moléculas las que a mayor escala se comportan como módulos de una fibra y éstas a su vez como módulos del músculo completo. Este resultado es congruente también con la noción de que tanto la molécula como las fibras y el músculo completo presentan las propiedades modulares, pasivas e histórico dependientes que se mencionan en el documento.

Es interesante también mencionar la gran cantidad de personas que esta interesada en el tema y que han publicado artículos sobre el mismo así como hacer la observación de la diversidad de formaciones (químicos, biólogos, físicos, médicos, etc.) de los científicos que trabajan en el problema, o bien, en alguna parte específica del mismo.

Bibliografía

Artículos Consultados

- BUSTAMANTE y otros. *Mechanical Fatigue in Repetitively Stretched Single Molecules of Titin. Biophysical Journal* **80**, 852-863, 2001.
- CAMPBELL, Moss y otros. *History-Dependent Mechanical Properties of Permeabilized Rat Soleus Muscle Fibers. Biophysical Journal* **82**, 929-943, 2002¹⁰.
- GAO y Schulten. *Simulated Refolding of Stretched Titin Immunoglobulin Domains. Biophysical Journal* **81**, 2268-2277, 2001⁵.
- GAUTEL, Mathias y otros. *The Mechanical Stability of Immunoglobulin and Fibronectin III Domain in the Muscle Protein Titin Measured by Atomic Force Microscopy. Biophysical Journal* **75**, 3008-3014, 1998.
- GRANZIER, Thierry y otros. *Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions. Journal of Applied Physiology* **92**, 1465-1472, 2002⁷.
- JÄGUER. *The "Sticky Chain": A Kinetic Model for the Deformation of Biological Macromolecules. Biophysical Journal* **81**, 1897-1906, 2001.
- KELLERMAYER y Granzier. *Elastic properties of single titin molecules made visible through fluorescent F-actin binding. Biochem.Biophys.Res.Commun.* **221**, 491-497, 1996⁴.
- KELLERMAYER y otros. *Mechanics and Structure of titin oligomers explored with atomic force microscopy. Biochimica et Biophysica Acta* **1604**, 105-114, 2003¹³.
- LEAKE y otros. *The elasticity of single Titin Molecules Using a two-bead Optical Tweezers Assay. Biophysical Journal* **87**, 1112-1135, 2004.
- LIEBER. *Skeletal Muscle is a Biological Example of a Linear Electro-Active Actuator. Annual International Symposium on Smart Structures end Materials 1999*⁹.

- LIN y otros. *Crossbridge muscle model parameters of different fiber types. Meeting of the American Society of Biomechanics University of California at San Diego. 2001*
- LI y otros. *Reverse Engineering of the giant muscle protein titin. Letters to Nature* **418**, 998-1002, 2002.
- LU y otros. *Unfolding Titin Immunoglobulin Domains by Steered Molecular Dynamics Simulation. Biophysical Journal*, **75**, 662-671, 1999¹⁷.
- MAKAROV y otros. *Kinetic Monte Carlo Simulations of Protein Folding and Unfolding. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas, 2002*¹⁵.
- MARÍN y otros. *Folding-unfolding of FnIII domains in tenascin: an elastically coupled two-state system. Journal of Biomechanics* **36**, 1733-1737, 2003¹⁶.
- MARSZALEK y otros. *Mechanical unfolding intermediates in titin modules. Letters to Nature* **402**, 100-103, 1999³.
- MINAJEVA, Kellermayer y otros. *Unfolding Titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils. Biophysical Journal* **80**, 1442-1451, 2001¹¹.
- RIEF y otros. *Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model of Biopolymer Extensibility. Physical Review Letters* **81**, 4764-4767, 1998.
- SCHULTEN y otros. *Steered Molecular Dynamics Studies of Titin II Domain Unfolding. Biophysical Journal* **83**, 3435-3445, 2002.
- SCHULTEN, Klaus y otros. *Steered Molecular Dynamics Simulations of Force-Induced Protein Domain Unfolding. Proteins* **35**, 453-463, 1999.
- SCIOTE y Morris. *Skeletal Muscle Function and Fibre Types. British Orthodontics* **27**, 15-30, 2000¹².
- TSKHOVREBOVA y otros. *Role of titin in vertebrated striated muscle. The Royal Society (Biological Sciences)* **357**, 199-206 2002.
- VAIN. *On Measurement of the Tone of Skeletal Muscles. Congress of the International Society of Biomechanics 1995*⁶.

Páginas Consultadas

- <http://www.cajal.csic.es/departam/depneurob/TTNB9/resare.htm>

- <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Proteins.html>
- <http://www.arrakis.es/~lluengo/pproteinas.html#GlossA>
- http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/6_3_33.html
- http://www.psc.edu/science/2000/schulten/rude_mechanicals.html ¹
- <http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/kscott/> ²
- <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/muscle/>
- <http://www.saludmed.com/FisiolEj/MuscE.html>
- <http://muscle.ucsd.edu/musintro/contractions.shtml>
- [http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Muscle/Muscle.htm#CONT
RACT](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Muscle/Muscle.htm#CONT
RACT)
- http://www.unm.edu/~toolson/435_tetanus_of_a_muscle_fiber_introduction.htm
↓
- <http://moon.ouhsc.edu/gsharp/namics/actpass.htm>
- http://www.botany.uwc.ac.za/sci_ed/grade10/mammal/muscle.htm
- <http://muscle.ucsd.edu/musintro/props.shtml>
- http://lmb.niams.nih.gov/nanotechnology/elastic_force_measurement.htm
- http://www.ks.uiuc.edu/Research/smd_imd/titin/
- <http://www.pitt.edu/~AFShome/g/i/gilbertw/public/html/jason/wlc.html> ¹⁴
- <http://www.ks.uiuc.edu/~barry/>
- http://www.ivy-rose.co.uk/Topics/Muscle_Structure.htm ⁸
- <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.6b1/ug/>