

The background of the entire page is a photograph of a bright blue sky filled with soft, white, wispy clouds. In the center of the image, there is a bright sun or star, which is slightly out of focus, creating a soft, glowing effect. The overall tone is peaceful and airy.

Actina

Erika Geraldine Zarate Tinoco

Índice

Introducción	5
Proteínas musculares	6
1.-Estructura del músculo	6
Proteínas contráctiles	6
2.- Fuerza para la contracción muscular.....	8
3.- Mecanismo de la actividad atpásica de la miosina.....	8
4.- Papel de la troponina y la tropomiosina.....	8
5.- La fuente de energía para la contracción muscular.....	9
6.- Las proteínas contráctiles en otras células.....	10
7.- La fuente de energía para la contracción muscular.....	10
8.- Las proteínas contráctiles en otras células.....	11
9.- Los microfilamentos.....	11
10.- Los microtubulios.....	12
El músculo esta formado por filamentos proteico gruesos y delgados que interaccionan entre si.....	14
Los filamentos gruesos y delgados se deslizan uno respecto al otro a medida que el músculo se contrae	15
La miosina forma los filamentos gruesos, hidroliza al ATP y se une a la actina de forma reversible	16
La miosina está formada por dos cabezas globulares unidas a una cola en forma de - hélices superenrolladas	17
La polaridad de los filamentos gruesos y delgado se invierte en la mitad del sarcómero	18
La actina se polimeriza formando filamentos delgados	19
La polaridad de los filamentos gruesos y delgados se invierte en la mitad del sarcómero	20
El impulso que origina la contracción se debe a cambios conformacionales en la cabeza s1 de la miosina.....	21
Esferas recubiertas con miosina de desplazan unidireccionalmente a lo largo de cables de actina orientados	22
La troponina y la tropomiosina intervienen en la regulación de la contracción muscular por el ION calcio	23
¿Cómo se regula la contracción muscular?.....	23
La actina y la miosina tienen funciones contractiles en prácticamente todas las células eucarióticas	24
Las oscilaciones de cilios y flagelos se producen por el deslizamiento de los microtubulos inducido por dineina	25
La rápida asociación y disociación de los microtúbulos dirigida por e GTP es esencial para la morfogénesis	27
La quinesina desplaza las vesículas y orgánulos unidireccionalmente a lo largo de los microtúbulos	28
Un único motor de quinesina es capaz de desplazar una vesícula a lo largo del microtúbulo.....	29
Las bacterias pueden nadar gracias a la rotación de sus flagelos	30

Propiedades del músculo esquelético:	32
Miosina:.....	32
Funciones:	32
Concepto:	32
Uniones transversales de los filamentos producen fuerza mecánica	33
Actina	33
Concepto	33
Interacción entre actina y miosina	34
Contracción muscular:	34
Los filamentos gruesos	34
La actina potencia actividad ATPasa de la miosina.....	35
La troponina y la tropomiosina intervienen en la regulación de la contracción muscular por el ION calcio	36
Músculo liso	37
Fuerza mecánica entre los filamentos gruesos y delgados	38
Los complejos de tropomiosina y troponina presentes en los filamentos efectúan a cabo funciones claves en el músculo estriado	39
El Ca^{2+} regula también la contracción del músculo liso	40
La fosforilación de las cadenas P ligeras de miosina inicia la contracción del músculo liso	41
La regulación basada en la actina tiene lugar en el músculo estriado.....	42
El retículo sarcoplásmico regula las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en el músculo esquelético.....	43
Información de internet	45
Músculo.....	45
Conclusión	46

Actina

Introducción

El músculo estriado de los vertebrados consta de dos clases de filamentos proteicos que interaccionan entre si. Los filamentos gruesos contienen miosina, mientras que los filamentos delgados contienen actina, tropomiosina y troponina. La hidrólisis del ATP unido a la miosina dirige el deslizamiento de estos filamentos, unos sobre otros. La miosina dirige el deslizamiento de estos filamentos, unos sobre otros. La miosina es una proteína muy grande (540 kd) compuesta de dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. Las cadenas pesadas están plegadas de tal forma que la miosina contiene dos regiones globulares (cabezas SI) unidas a un vástago α -helicoidal de doble hebra; cada cabeza SI lleva unidas dos cadenas ligeras. Las cabezas SI y parte del vástago forman puentes cruzados que interaccionan con la actina para generar la fuerza contráctil. El resto de la molécula de miosina forma el esqueleto del filamento grueso. La actina es una proteína globular (42 kd) que se polimeriza para formar los filamentos delgados. Los filamentos delgado y grueso tienen dirección, que se invierte a la mitad de camino entre las líneas Z. La unión e hidrólisis del ATP dirige la formación y disociación cíclica de complejos entre los puentes cruzados de miosina de los filamentos gruesos y las unidades de actina de los filamentos delgados, acortando con ello la distancia entre las líneas Z. El golpe de potencia de la contracción muscular procede de cambios conformacionales que tienen lugar en las cabezas SI, modificando su afinidad por la actina. Las bisagras entre los diferentes dominios de la miosina son importantes porque permiten a las cabezas SI unirse y liberarse reversiblemente de la actina y cambiar su orientación cuando están unidas.

Proteínas musculares

1.-Estructura del músculo

Las células contráctiles de los músculos esqueléticos son muy largas y multinucleadas. La membrana celular se llama sarcolema. Gran parte de la célula está ocupada por elementos contráctiles, las miofibrillas, que están dispuestos manojos paralelos al eje de contracción. Cada miofibrilla tiene alrededor de 1 mm de diámetro. Las miofibrillas están inmersas en un citosol llamado sarcoplasma que contiene glucógeno, enzimas glucolíticas ATP, ADP, AMP, fosfocreatina, creatina, diversos aminoácidos y electrolitos inorgánicos.

En los músculos rojos se encuentran muchas mitocondrias dispuestas regularmente.

Una micografía electrónica de una miofibrilla presenta una unidad funcional llamada sarcómero que se repite cada 2,3 μm a lo largo del eje de la miofibrilla. Hay una alternancia regular de una banda oscura A y una banda clara I. La parte central de la banda A, llamada zona H, es menos densa que el resto de la banda. En medio de la zona H hay una línea oscura M. La banda I está dividida en dos partes por una línea Z muy densa.

La sección transversal de las miofibrillas revela dos clases de filamentos: unos filamentos gruesos de alrededor de 150 $\text{\AA}$ de diámetro y otros delgados de unos 70 $\text{\AA}$ de diámetro. Los filamentos gruesos son de miosina y los delgados contienen actina, tropomiosina y troponina. La banda I consta sólo de filamentos delgados mientras que en la zona H de la banda A están presentes sólo filamentos gruesos. En otras partes de la banda A están presentes ambos tipos de filamentos. Cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos delgados y cada filamento delgado por tres gruesos. Los filamentos gruesos y delgados interaccionan mediante puentes emergentes a intervalos regulares entre las superficies de los filamentos gruesos y delgados.

Existen por lo menos dos tipos de fibras musculares estriadas: fibras rojas y fibras blancas. Las fibras rojas tienen una gran cantidad de sarcoplasma y contienen más núcleos y mitocondrias que las fibras blancas. Las fibras rojas contienen también una mayor cantidad de mioglobina o hemoglobina muscular que acepta O_2 de la hemoglobina sanguínea. De este modo la mioglobina oxigenada sirve como un reservorio de oxígeno de las fibras musculares. Las fibras rojas de contracción rápida tienen una alta capacidad respiratoria y glucogenolítica, y alta actividad ATPásica de la miosina. Los músculos rojos de contracción lenta tienen alta capacidad respiratoria, baja capacidad glucogenolítica y baja actividad ATPásica de la miosina. Las fibras musculares blancas de contracción rápida tienen baja capacidad respiratoria, alta capacidad glucogenolítica y alta actividad ATPásica de la miosina.

Cuando el músculo se contrae, se acorta. Durante la contracción no cambia la longitud de los filamentos gruesos y delgados, pero la longitud del sarcómero disminuye por aproximación y superposición de los filamentos gruesos y delgados. Durante la contracción la longitud de la banda A permanece constante, lo que quiere decir que no cambia la longitud de los filamentos gruesos. Tampoco cambia la longitud de los filamentos delgados porque la distancia entre la línea Z y el borde adyacente de la zona H no cambia. Al contrario, el tamaño de la zona H y de la banda I disminuyen durante la contracción por superposición de los filamentos gruesos y delgados.

Proteínas contráctiles

La miosina es la proteína más abundante del músculo esquelético, representa el 60-70% de las proteínas totales y es el mayor constituyente de los filamentos gruesos. La miosina es una ATPasa, hidroliza el ATP para formar ADP y Pi, reacción que proporciona la energía para la contracción muscular.

La miosina está compuesta de dos idénticas cadenas pesadas cada una de 230 Kd, y 4 cadenas livianas de 20 Kd cada una. La molécula tiene una región globular de doble cabeza unida a una larga cadena helicoidal de doble hebra. Cada cabeza se une a dos diferentes cadenas ligeras. Todas las miosinas tienen la secuencia:

Glu - Glu - Ser - Ala - Gli - LIS - Tre

Que es similar a la secuencia encontrada en el sitio activo de otras ATPasas. La lisina se une al alfa fosfato del ATP.

La estructura alfa helicoidal ininterrumpida de la cola de la miosina es favorecida por la ausencia de prolina en intervalos de más de 1000 residuos y por la abundancia de leucina, alanina y glutamato.

La porción globular de la miosina tiene actividad ATPásica y se combina con la actina. Dos de las cadenas ligeras son idénticas (una en cada cabeza) y pueden ser removidas sin pérdida de la actividad ATPásica. Las otras dos cadenas ligeras no son idénticas y se ven requeridas para la actividad ATPásica y para la unión de la miosina a la actina.

La miosina puede escindirse con la tripsina en dos fragmentos llamados meromiosina ligera y meromiosina pesada.

La meromiosina ligera forma filamentos, carece de actividad ATPásica y no se combina con la actina; es una cadena de doble hebra alfa helicoidal de 850 Å de longitud. La meromiosina pesada cataliza la hidrólisis del ATP, se une a la actina, pero no forma filamentos y genera la fuerza para la contracción muscular; consta de una barra corta unida a dos dominios globulares que son las cabezas de la miosina. La meromiosina pesada puede escindirse por la papaína en dos subfragmento en forma de bastón llamado S2. Cada fragmento S1 tiene un sitio con actividad ATPásica y un sitio de unión a la actina.

La actina es el mayor constituyente de los filamentos delgados. En soluciones de baja fuerza iónica, la actina es un monómero llamada actina G debido a su forma globular. A pH fisiológico la actina G se polimeriza y toma la forma fibrosa F que se parece a los filamentos delgados. La actina F es una hélice de doble filamento de monómeros de actina de 90 Å de diámetro. La estructura se repite a intervalos de 360 Å a lo largo del eje de la hélice.

Cuando una solución de miosina se agrega a una solución de actina se forma el complejo actomiosina con gran incremento de la viscosidad de la solución. Este incremento se revierte con la adición de ATP. El ATP disocia la actomiosina en actina y miosina. Se puede preparar hebras de actomiosina, las cuales, si se sumergen en una solución que contiene ATP, K^+ y Mg^{2+} , se contraen. Esto no ocurre si las hebras son hechas sólo de miosina. Estos experimentos fueron hechos por Albert Zsentsy Gyorgy y sugerían que la fuerza para la contracción muscular provenía de la interacción miosina, actina, ATP.

La tropomiosina es una molécula en forma de bastón asociada a los filamentos de actina. Consta de dos cadenas polipeptídicas similares en alfa hélice enrolladas una alrededor de la otra en un ensamblaje tipo cabeza cola y unida no covalentemente a las cadenas de F actina.

La troponina es una molécula esférica unida a los filamentos de actina. Está constituida por tres subunidades

- a. la troponina C, una proteína que se une al calcio para producir cambios conformacionales.
- b. b) troponina I, una proteína inhibitoria de la interacción actina - miosina y de la actividad ATPásica.
- c. c) _roponina, T, una proteína que une la _roponina C a la _roponina I y estas dos al complejo actina - _roponina_na. La probable posición relativa de la _roponina_na, _roponina y actina, en el filamento delgado del músculo. La _roponina_na yace en la hendidura que forma la hélice. Hay una _roponina_na y una _roponina por cada 7 pares de actina G.

La alfa actinina es la proteína que une los filamentos de actina a la línea Z.

El componente gamma, asociado a la _roponina, es una enzima, la creatina quinasa.

La proteína C interviene en el ensamblaje de las moléculas de miosina en los filamentos gruesos.

La beta actinina, asociada a la actina F, interviene en el ensamblaje de los filamentos delgados.

La M proteína se encuentra en las líneas M.

2.- Fuerza para la contracción muscular

La energía para la contracción muscular proviene de la hidrólisis del ATP. La miosina tiene actividad ATPásica. El ATP unido a la miosina es rápidamente hidrolizado, pero el ADP y Pi permanecen unidos a la miosina y se disocian muy lentamente. La actina se une al complejo miosina - ADP -Pi y acelera la liberación de los productos. Ocurrido esto, la actomiosina se une al ATP, lo que produce disociación de la actina y miosina, y el complejo que produce ATP - miosina resultante está listo para otro ciclo catalítico. Las reacciones requieren Mg^{2+} .

La fuerza para la contracción es generada por la formación y disociación cíclica de complejos entre la actina y las cabezas S1 de la miosina. Durante una simple contracción S1 de la miosina. Durante una simple contracción ocurren ciclos repetidos de unión, tracción y separación. No se sabe cómo es articulado el ciclo. No hay un modelo definitivo para la conversión de la energía química en energía mecánica.

3.- Mecanismo de la actividad atpásica de la miosina

Ha sido propuesto un mecanismo probable para la generación de fuerza para la contracción muscular. En el músculo en reposo, las cabezas S1 de los filamentos gruesos están separadas de los filamentos delgados (I); el ADP y Pi, productos de la hidrólisis del ATP, están ligados a la miosina. Cuando el músculo es estimulado, la cabeza S1 se une a la actina en los filamentos delgados (II), Pi se separa del complejo miosina -ADP-Pi y S1 cambia de estructura y orientación en relación con la actina, lo que genera el impacto de fuerza de la contracción. El filamento delgado sufre una tracción de 75 Å (III); el ADP se disocia y la unión subsecuente del ATP revierte el cambio de conformación de S1 la que se separa rápidamente de la actina (IV). Finalmente, el ATP es hidrolizado por la cabeza libre de miosina y se repite el proceso.

Las moléculas de miosina tienen dos tipos de uniones que permiten que las cabezas S1 se unan y se separen de la actina y cambien su orientación cuando están unidas. Hay un tipo de unión entre las cabezas S1 y el bastón S2 y otro tipo entre S2 y la unidad ligera de meromiosina. Las uniones son zonas flexibles vulnerables a la acción proteolítica de las enzimas. El papel de S2 es transmitir la tensión de S1 unido al filamento delgado, al dominio de la meromiosina ligera que conforma el filamento grueso. La unión de S1 y S2 permite la interacción de S1 con la actina con una orientación que difiere según que el ADP esté o no unido. La otra unión entre S2 y la meromiosina ligera (MML) permite variaciones en las posiciones de S1 con respecto al filamento grueso. Esto habilita una interacción precisa con la actina.

La unión del ATP al sitio catalítico de S1 produce la separación de la actina a otro sitio que está por lo menos a 60 Å de distancia. S1 se une fuertemente a ATP o a la actina, pero no a ambos; prefiere el ATP, el cual es hidrolizado formando ADP - Pi - miosina que libera Pi con producción de cambios conformacionales e incremento de la afinidad de la miosina por la actina. Como el ADP no se disocia inmediatamente, la actina y miosina interaccionan fuertemente generando fuerza entre los dos sets de filamentos. La caída de energía libre (7 Kcal/mole) en esta etapa y los cambios conformacionales originan el impulso de fuerza. La liberación subsecuente del ADP permite la unión al ATP que induce la liberación de actina de S1. De esta manera, la energía libre del ATP se usa para disociar actina de miosina y para liberar Pi a fin de que la miosina pueda unirse fuertemente a la actina generando fuerza.

Se han preparado perlas cubiertas con miosina. Estas perlas se mueven unidireccionalmente a lo largo de cables de actina en presencia de ATP, el cual es hidrolizado. Alternativamente, los filamentos de actina pueden moverse sobre superficies de vidrio cubiertas con miosina si el ATP está presente. La meromiosina pesada se mueve con la misma velocidad que la miosina intacta, lo cual indica que la cola de 850 Å de la miosina no interviene en la generación de la fuerza contráctil. Efectivamente, los filamentos de actina se desplazan sobre películas cubiertas con S1. De manera que ninguna porción de la cola alfa helicoidal es esencial para el movimiento. La fuerza para la contracción muscular se genera dentro de la cabeza S1.

4.- Papel de la troponina y la tropomiosina

Ya hemos visto que la troponina y la tropomiosina son componentes de los filamentos delgados, los que están constituidos predominantemente de actina.

El regulador fisiológico de la contracción muscular es el calcio. En los músculos esqueléticos en reposo, el calcio es secuestrado en el retículo sarcoplásmico por un transporte activo, mantenido por el ATP, que disminuye la concentración de calcio citoplásmico. Un impulso nervioso incrementa el calcio citosólico y produce la contracción muscular. El efecto del calcio en la interacción actina miosina es mediado por la

tropomiosina y el complejo troponina. La troponina C se une a los iones de Ca^{2+} . La troponina I se une a la actina y la troponina T se une a la tropomiosina. Cada complejo de troponina regula las interacciones de 7 unidades de actina.

La troponina C es el componente sensor del Ca^{2+} . Tiene dominios de alta y baja afinidad por el calcio. En el músculo en reposo, los sitios de alta afinidad son ocupados por el Ca^{2+} mientras que los de baja afinidad están vacíos. Cuando el calcio es liberado del retículo sarcoplásmico, éste ocupa los sitios de baja afinidad produciéndose un cambio de conformación que es transmitido a los otros componentes del complejo troponina y luego a la tropomiosina. Parece que la troponina T, que es elongada, controla la posición de la tropomiosina en el filamento delgado entre la actina y la cabeza S1 de la miosina. Un pequeño cambio en la posición de la tropomiosina puede alterar marcadamente la unión de actina a S1 o la capacidad de este complejo para sufrir cambios estructurales. La tropomiosina se mueve delante de las cabezas S1 de la miosina cuando el músculo esquelético es activado por impulsos nerviosos. Las observaciones de la motilidad in vitro, proporcionan evidencias adicionales sobre el papel de la troponina y tropomiosina en la regulación de la contracción muscular. El movimiento de perlas cubiertas con miosina sobre cables de actina es insensible al Ca^{2+} cuando están presente sólo esas dos proteínas. Si se adiciona troponina y tropomiosina, las perlas responden al calcio. El movimiento es bloqueado si el Ca^{2+} está ausente y se restaura con su adición. Un sistema con miosina, actina, troponina y tropomiosina presenta un movimiento regulado por el Ca^{2+} .

La miosina del músculo estriado de los vertebrados contiene tres clases de cadenas ligeras (LC1, LC2 y LC3). La fosforilación de la cadena LC2 por una quinasa estimulada por el Ca^{2+} duplica la actividad ATPásica de la miosina estimulada por la actina. Se ignora la importancia fisiológica de este cambio. El músculo liso no es regulado por la troponina tropomiosina sino por el grado de fosforilación de LC2 produce contracción y su defosforilación relajación. La contracción del músculo liso es inducido por el incremento del calcio citosólico. La actividad del músculo liso es modulado por la epinefrina que actúa como relajante. La epinefrina actúa a través del cAMP fosforilando una quinasa de cadena ligera. Esto baja la afinidad por el Ca^{2+} y disminuye la proporción de miosina fosforilada produciéndose la relajación muscular.

5.- La fuente de energía para la contracción muscular

La energía para la contracción muscular proviene de la hidrólisis del ATP. En el músculo en reposo hay suficiente ATP sólo para mantener la contracción por una fracción de segundo. Los músculos de los mamíferos contienen una reserva de fosfato de alta energía en forma de fosfocreatina. La fosfocreatina se forma por la acción de la creatina quinasa que cataliza la reacción reversible:

La energía libre de hidrólisis de la fosfocreatina es de -10.3 Kcal/mol para el ATP. De modo que cuando se forma el ATP de fosfocreatina, el cambio de energía libre es de -3 Kcal/mol.

En el músculo en reposo hay alrededor de 4 mM de ATP, 0,01 mM de ADP, 25 mM de fosfocreatina y 13 mM de creatina.

La fosfocreatina mantiene altas concentraciones de ATP durante la actividad muscular. Va reemplazando el ATP que son consume y es la mayor fuente de fosfatos de alta energía durante los primeros cuatro segundos de un ejercicio intenso.

Durante la actividad muscular, el nivel de ATP se mantiene mientras haya fosfocreatina disponible y disminuye cuando ésta se agota. El nivel de ADP y Pi incrementa rápidamente en la contracción muscular y el AMP incrementa por acción de la adenilato quinasa que cataliza la reacción reversible.



Al reducirse la carga energética en los músculos en actividad, se estimulan los procesos metabólicos que generan ATP: la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico. Estos procesos son estimulados por el ADP, un modulador alostérico positivo. La glucólisis es también estimulada por el AMP, modulador positivo de la fosfofructoquinasa.

La fuente primaria de energía para la refosforilación del ADP y de la fosfocreatina no es idéntica para todos los músculos. Aun cuando todos los músculos de los vertebrados ostentan actividad glucolítica y respiratoria, la contribución relativa de la glucólisis y la respiración a la formación de ATP varía considerablemente. Las fibras musculares son de dos tipos principales: las fibras rojas o lentas y las fibras

blancas o rápidas. Los músculos rojos tienen un alto contenido de mioglobina y citocromos. En estos músculos, la respiración es la fuente principal de energía para la fosforilación del ADP vía fosforilación oxidativa. Estos músculos tienen mitocondrias en abundancia, tal es el caso del músculo cardíaco y los músculos que intervienen en el vuelo de las aves. Los músculos blancos contienen poca *_xidación_* y pocas mitocondrias. En ellos la glucólisis es la *_xidación_* fuente de energía para la refosforilación del ATP. Algunos músculos contienen los dos tipos de fibras. En general, los músculos rojos utilizan ácidos grasos como su mayor fuente de energía vía *_xidación_* a acetil-CoA y CO₂ en el ciclo de Krebs. Los músculos blancos utilizan glucosa como mayor fuente energética.

Algunos invertebrados utilizan arginina fosfato para almacenar en el músculo grupos fosforilos de alta energía. La arginina fosfato, al igual que la creatina fosfato, tiene un grupo fosfoguanido. La transferencia de grupos fosforilos de arginina fosfato al ADP es catalizada por la arginina fosfoquinasa.

6.- Las proteínas contráctiles en otras células

La ameba está provista de mecanismos de locomoción. Se ha aislado de la *Acanthamoeba castellanii* una proteína muy parecida a la actina del músculo esquelético del conejo y capaz de combinarse con la miosina del músculo de este animal para formar un complejo híbrido de actomiosina. Aún más, la composición de aminoácidos de la actina de la *Acanthamoeba* es muy similar a la de la actina del músculo de conejo indicando que ambas actinas, tan diferentes, tienen un antecesor común y han experimentado muy pocos cambios evolutivos. La *Acanthamoeba* también contiene una proteína parecida a la miosina con actividad ATPásica y capacidad de unión ala actina, pero esta miosina no forma filamentos gruesos. Un extremo del filamento de actina de la *A. castellanii* se fija a la superficie interna de la membrana celular, mientras que la ATPasa, que se une a la actina, se extiende hacia el citoplasma. Su interacción posiblemente origina una corriente en el citoplasma que se traduce en un movimiento ameboide.

Las plaquetas sanguíneas presentan formación de pseudópodos y cambian de forma debido a la presencia de actina y miosina que son muy similares a las proteínas musculares.

Del cerebro se han aislado complejos de actomiosina que parecen estar asociados a las vesículas sinápticas que segregan neurotransmisores durante la transmisión sináptica del impulso nervioso.

La actina constituye el 10% de las proeínas de las células eucarióticas. La miosina es una proteína menos conservada que la actina en el proceso evolutivo. Las células no musculares contienen 10 a 100 veces menos miosina que actina.

Recientemente se han introducido estudios genéticos para determinar el papel de la actina y la miosina en las células no musculares. Uno de los procedimientos es el de la disrupción del gene para producir interferencia de un gen particular y estudiar sus consecuencias.

7.- La fuente de energía para la contracción muscular

La energía para la contracción muscular proviene de la hidrólisis del ATP. En el músculo en reposo hay suficiente ATP sólo para mantener la contracción por una fracción de segundo. Los músculos de los mamíferos contienen una reserva de fosfato de alta energía en forma de fosfocreatina. La fosfocreatina se forma por la acción de la creatina quinasa que cataliza la reacción reversible:

La energía libre de hidrólisis de la fosfocreatina es de -10.3 Kcal/mol comparado con -7.3cal/mol para el ATP. De modo que cuando se forma el ATP de fosfocreatina, el cambio de energía libre es de -3 Kcal/mol.

En el músculo en reposo hay alrededor de 4 mM de ATP, 0.01 mM de ADP, 25Mm de fosfocreatina y 13mM de creatina.

La fosfocreatina mantiene altas concentraciones de ATP durante la actividad muscular. Va reemplazando el ATP que se consume y es la mayor fuente de fosfatos de alta energía durante los primeros cuatro segundos de un ejercicio intenso.

Durante la actividad muscular, el nivel de ATP se mantiene mientras haya fosfocreatina disponible y disminuye cuando ésta se agota. El nivel de ADP y Pi incrementa rápidamente en la contracción muscular y el AMP incrementa por acción de la adenilato quinasa que cataliza la reacción reversible.

2ADP → ATP + AMP

Al reducirse la carga energética en los músculos en actividad, se estimulan los procesos metabólicos que generan ATP: la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico. Estos procesos son estimulados por el ADP, un modulador alostérico positivo. La glucólisis es también estimulada por el AMP, modulador positivo de la fosfofructoquinasa.

La fuente primaria de energía para la refosforilación del ADP y de la fosfocreatina no es idéntica para todos los músculos. Aun cuando todos los músculos de los vertebrados ostentan actividad glucolítica y respiratoria, la contribución relativa de la glucólisis y la respiratoria, la contribución relativa de la glucólisis y la respiración a la formación de ATP varía considerablemente. Las fibras musculares son de dos tipos principales: las fibras rojas o lentas y las fibras blancas o rápidas. Los músculos rojos tienen un alto contenido de mioglobina y citocromos. En estos músculos, la respiración es la fuente principal de energía para la fosforilación del ADP vía fosforilación oxidativa. Estos músculos tienen mitocondrias en abundancia, tal es el caso del músculo cardíaco y los músculos que intervienen en el vuelo de las aves. Los músculos blancos contienen poca mioglobina y pocas mitocondrias. En ellos la glucólisis es la principal fuente de energía para la refosforilación del ATP. Algunos músculos contienen los dos tipos de fibras. En general, los músculos rojos utilizan ácidos grasos como su mayor fuente de energía vía oxidación a acetil - CoA y CO₂ en el ciclo de Krebs. Los músculos blancos utilizan glucosa como mayor fuente energética.

Algunos invertebrados utilizan arginina fosfato para almacenar en el músculo grupos fosforilos de alta energía. La arginina fosfato, al igual que la creatina fosfato, tiene un grupo fosfoguanido. La transferencia de grupos fosforilos de la arginina fosfato al ADP es catalizada por la arginina fosfoquinasa.

8.- Las proteínas contráctiles en otras células

La ameba está provista de mecanismos de locomoción. Se ha aislado de la *Acanthamoeba castellanii* una proteína muy parecida a la actina del músculo esquelético del conejo y capaz de combinarse con la miosina del músculo de este animal para formar un complejo híbrido de actomiosina. Aún más, la composición de aminoácidos de la actina de la *Acanthamoeba* es muy similar a la de la actina del músculo de conejo indicando que ambas actinas, tan diferentes, tienen un antecesor común y han experimentado muy pocos cambios evolutivos. La *Acanthamoeba* también contiene una proteína parecida a la miosina con actividad ATPásica y capacidad de unión a la actina, pero esta miosina no forma filamentos gruesos. Un extremo del filamento de actina de la *A. castellanii* se fija a la superficie interna de la membrana celular, mientras que la ATPasa, que se une a la actina, se extiende hacia el citoplasma. Su interacción posiblemente origina una corriente en el citoplasma que se traduce en un movimiento ameboide.

Las plaquetas sanguíneas presentan formación de pseudópodos y cambian de forma debido a la presencia de actina y miosina que son muy similares a las proteínas musculares.

Del cerebro se han aislado complejos de actomiosina que parecen estar asociados a las vesículas sinápticas que segregan neurotransmisores durante la transmisión sináptica del impulso nervioso.

La actina constituye el 10% de las proteínas de las células eucarióticas. La miosina es una proteína menos conservada que la actina en el proceso evolutivo. Las células no musculares contienen 10 a 100 veces menos miosina que actina.

Recientemente se han introducido estudios genéticos para determinar el papel de la actina y la miosina en las células no musculares. Uno de los procedimientos es el de la disrupción del gene para producir interferencia de un gen particular y estudiar sus consecuencias.

9.- Los microfilamentos

Las células eucarióticas tienen un armazón interno llamado citoesqueleto que les da distintas formas. El citoesqueleto permite a las células transportar vesículas, cambiar de forma y migrar. Esta estructura dinámica está constituida por microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Los microfilamentos son hechos de actina y los filamentos intermedios y microtúbulos de otras proteínas.

En las células no musculares, los microfilamentos forman estructuras transitorias en constante formación y disolución. Crecen por adiciones sucesivas de monómeros de actina al extremo terminal. La polimerización ocurre por un proceso cooperativo. La actina está unida al ATP o al ADP y cataliza la hidrólisis del ATP. La

ATP - actina tiene mayor tendencia a plimerizarse que la ADP - actina. Una proporción significativa de la actina no se polimeriza debido a la presencia de proteínas de control que se unen a la actina. La citochalasin es un alcaloide extraído del hongo *Helminthosporium dematoidium* que interfiere con el ensamblaje de los filamentos de actina. En células tratadas con citochalasin desaparecen los microfilamentos y, en consecuencia, se inhiben muchos procesos celulares tales como la fagocitosis, pinocitosis, citoquinesis, exocitosis, la retracción del coágulo por las plaquetas, el crecimiento de los axones ganglionares, la división del huevo fertilizado de erizo de mar, etc., etc.

La paloidina, un tóxico extraído de la *Amanita phalloides*, se une a las unidades de actina de los microfilamentos impidiendo su polimerización. En consecuencia, se bloquean los movimientos celulares que requieren la renovación de los microfilamentos en forma semejante a lo que ocurre con la citochalasin.

Las células animales también contienen filamentos intermedios. Las proteínas de estos filamentos presentan alfa hélices de tres hebras de unos 300 residuos de longitud. Entre estos filamentos intermedios están las queratinas que contribuyen a la estabilidad mecánica de las cepas epiteliales y constituyen la proteína más abundante de la piel y los pelos. Las neuronas contienen neurofilamentos, los músculos desmin filamentos. En algunas células existen los llamados vimentin filamentos. Los lamin filamentos rodean el núcleo.

10.- Los microtubulis

Los microtúbulis son filamentos tubulares que participan en el movimiento de los cromosomas. Constituyen elementos de apoyo para dar forma a las células. Se encuentran en los axones de las fibras nerviosas, los cilios, los flagelos, la cola de los espermatozoides y los fibroblastos que son células del tejido conectivo que forman colágeno por acción mecánica de los microtúbulis.

Los microtúbulis se forman por agregación de moléculas de tubulina, una proteína globular que tiene dos subunidades (alfa y beta). El túbulo consiste en hélices alternadas de subunidades alfa y beta de tubulina. El número de subunidades en la circunferencia es generalmente 13, variando de 10 a 14.

Los cilios y flagelos son organelos parecidos al cabello que emergen de la superficie celular. Las células libres como los protozoarios o el espermatozoide son impulsados por cilios o flagelos. Los cilios y flagelos se componen de un manojo de fibras llamado axonema rodeado de una membrana que es la continuación de la membrana plasmática. Las fibras del axonema son microtúbulis. Un axonema contiene nueve pares de fibras exteriores y dos fibras centrales, diseño que es denominado a menudo disposición 9 + 2. Los detalles de la estructura del axonema se puede apreciar en la proyección expresada. Cada uno de los 9 dobletes externos simulan un número 8. El integrante más pequeño del par es la subfibra.

A que está unida al casquete que cubre las fibras centrales mediante barras radiales, de cada subfibra A emergen dos brazos que apuntan en la misma dirección. Estos brazos que apuntan en la misma dirección. Estos brazos están hechos con dineína que es una proteína con actividad ATPásica y que se puede solubilizar tratando los cilios con detergentes. La dineína es una proteína de 1500 Kd que tiene tres cabezas y un tallo. La actividad ATPásica está localizada en las cabezas en forma similar que en la miosina. La unión del ATP a la dineína produce la separación de los brazos de la subfibra adyacente. La hidrólisis del ATP ligado produce ADP-Pi-dineína que se une de nuevo a la subfibra adyacente y se produce la liberación de Pi, tal como ocurre en el músculo cuando S₁ se une a la actina. El impulso de fuerza posiblemente ocurre en esta etapa. Dicho de otro modo, los brazos de dineína de la subfibra A de un doblete migran hacia la subfibra B de un doblete adyacente cuando el ATP es hidrolizado. En el cilio intacto, las barras radiales se oponen a este desplazamiento, lo que se traduce en dobladuras locales. De allí que la diferencia entre los músculos y los cilios está en que los sarcómeros se acortan mientras que los exonemas se doblan.

El movimiento coordinado es trascendental para la vida. Este capítulo considera tres sistemas de motilidad en los eucariotas, impulsados por el ATP. En los eucariotas superiores, la contracción muscular está mediada por el deslizamiento paralelo de los filamentos de miosina y actina interdigitados. De hecho, la mayoría de las células eucariotas, desde las levaduras hasta las del hombre, son capaces de realizar movimientos gracias a la interacción entre la miosina y la actina. La agitación de los cilios y flagelos depende de las interrelaciones entre dos proteínas diferentes: dineína y tubulina. Determinados microtúbulos, contruidos con tubulina, forman el huso mitótico, que organiza el desplazamiento de los cromosomas durante la división celular. También sirven como guías o ralles para el desplazamiento dentro de las células de las vesículas y orgánulos, así como para el transporte de las vesículas de secreción a lo largo de los axones de las neuronas. La quinesina es una de las diferentes proteínas que median en el movimiento de las vesículas a lo largo de los microtúbulos. La unión del ATP a la miosina, dineína y

quinesina provoca transiciones conformacionales en estas proteínas motrices. Estos cambios estructurales se revierten cuando el ATP unido se hidroliza y se libera ADP y P_i , de forma que la proteína motriz avanza a lo largo del raíl de actina o de tubulina.

Las bacterias utilizan otras clase de motores y distintas fuentes de energía para moverse. Se impulsan mediante la rotación de los motores de los flagelos, localizados en la membrana citoplasmática. Estos motores están impulsados por la fuerza promotriz, no por el ATP. ¿Cómo es posible que estos ciclos conformacionales provocados por el ATP o los protones en estas máquinas moleculares puedan traducirse en un movimiento coordinado? El uso integrado de una amplia gama de técnicas instrumentales, que abarcan campos como la química de proteínas, la biología estructural o la genética molecular, está revelando los misterios del movimiento direccionalizado.

El músculo esta formado por filamentos proteico gruesos y delgados que interaccionan entre si

Empezamos con la base estructural de la contracción del músculo estriado en vertebrados, el proceso generador de fuerza que mejor entendemos. Los músculos de contracción voluntaria de los vertebrados tienen, cuando se examinan al microscopio óptico, un aspecto estriado. Constan de células multinucleadas rodeadas por una membrana plasmática excitable eléctricamente. Una célula muscular contiene muchas miofibrillas paralelas, cada una de ellas con un diámetro de 1 μm , que están inmersas en el citosol. Una micrografía electrónica de la sección longitudinal de una miofibrilla exhibe una enorme cantidad de detalles estructurales. La unidad funcional, denominada sarcómero, se repite cada 2,3 μm (23 000 Å) a lo largo del eje de la fibrilla. La banda A oscura y la banda I clara alternan con regularidad. La región central de la banda A denominada zona H, es menos densa que el resto de la banda. La banda I está cortada por una línea estrecha muy densa, Z.

Las secciones transversales de una miofibrilla descubren la distribución molecular subyacente del sarcómero, mostrando que existen dos clases de filamentos proteicos que interaccionan entre si. Los filamentos gruesos tienen un diámetro de unos 15 nm (150 Å), mientras que los filamentos delgados tienen un diámetro 9 nm (90 Å). los filamentos gruesos contienen principalmente miosina. Los filamentos delgados contienen actina, tropomiosina y el complejo de la troponina. Cada filamento delgado tiene como vecinos tres filamentos gruesos y cada filamento grueso está rodeado a su vez por seis filamentos delgados. Los filamentos delgados y gruesos interaccionan mediante puentes cruzados, constituidos por regiones cruzados sobresalen, a intervalos regulares, de los filamentos gruesos y ocupan un hueco de unos 13 nm existente entre la superficie de los filamentos gruesos y delgados.

Los filamentos gruesos y delgados se deslizan uno respecto al otro a medida que el músculo se contrae

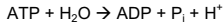
El músculo, al contraerse, se acorta hasta un tercio de su longitud original ¿Qué es lo que causa este acortamiento? En la década de los años 50 Andrew Huxley y Ralph Niedergerke por una parte, y Hugh Huxley y Jean Hanson por otra propusieron independientemente un modelo de filamentos deslizantes apoyándose en estudios de rayos X, microscopía óptica y microscopía electrónica. Las características esenciales de este preciso e imaginativo modelo son:

1. La longitud de los filamentos gruesos y delgados no cambia durante la contracción muscular.
2. En lugar de ello, la longitud del sarcómero decrece porque los dos tipos de filamentos se superponen más: Los filamentos gruesos y delgados se deslizan uno sobre otro durante la contracción.
3. La fuerza de contracción se genera mediante un proceso que mueve activamente un tipo de filamento sobre los filamentos vecinos del otro tipo.

El modelo de los filamentos deslizantes se apoya en las medidas de la longitud de las bandas A e I y la de la zona H en los músculos estirados, contraídos y en reposo. La longitud de la banda A es constante, lo que significa que los filamentos gruesos no cambian de tamaño. La distancia entre la línea Z y el borde adyacente de la zona H también es constante, lo que indica que los filamentos delgados tampoco cambian de tamaño. Por el contrario, el tamaño de la zona H y el de la banda I disminuyen durante la contracción, porque los filamentos delgados y gruesos se superponen más.

La miosina forma los filamentos gruesos, hidroliza al ATP y se une a la actina de forma reversible

La miosina tiene tres actividades biológicas importantes. Primero, en disoluciones de fuerza iónica y pH fisiológicos, las moléculas de miosina se ensamblan espontáneamente en filamentos. De hecho, el filamento grueso consta principalmente de moléculas de miosina. Segundo, la miosina es un enzima. Vladimir Engelhardt y Militsa Lyubimova descubrieron en 1939 que la miosina era una ATPasa.



Esta reacción global, que tiene lugar mediante una serie de pasos discretos proporciona la energía libre necesaria para la contracción muscular. Tercero, la miosina se une a la forma polimerizada de la actina (F-actina), el componente principal del filamento delgado. De hecho, esta interacción es indispensable para generar la fuerza que hace desplazar a los filamentos gruesos y delgados uno sobre otro. Podemos considerar a la miosina como un mecanoenzima, ya que cataliza la conversión de la energía contenida en los enlaces químicos en energía mecánica.

Cuando se añade una disolución de actina a una disolución de miosina se forma un complejo llamado actomiosina. La formación de este complejo va acompañada por un gran aumento en la viscosidad de la disolución. En los años 40, Albert Szent - Gyorgyi demostró que este aumento en la viscosidad se invertía con la adición de ATP. Esta observación reveló que el ATP disocia a la actomiosina en actina y miosina. Szent - gyorgyi también preparó hebras de actomiosina en las cuales las moléculas se orientaban en el seno de una corriente fluida. Se obtuvo un resultado sorprendente cuando las hebras se sumergieron en una disolución que contenía ATP, K^+ y Mg^{2+} . Las hebras de actomiosina se contrajeron, mientras que las hebras formadas solamente por miosina no lo hicieron. Estos experimentos incisivos sugirieron que la fuerza de la contracción muscular se produce por la interacción de miosina, actina y ATP.

La actividad ATPasa de la miosina es potenciada extraordinariamente por la acción de la actina -F. Por cierto, Albert Szent - Gyorgyi llamó actina a esta proteína por su capacidad de activar la hidrólisis del ATP realizada por la miosina. La actina aumenta el número de recambio de la miosina en unas 200 veces, de 0,05 s⁻¹ a 10 s⁻¹. El ATP unido a la miosina se hidroliza con rapidez, pero los productos ADP y P_i tardan en abandonarla. La actina aumenta el número de recambio de la miosina mediante su unión al complejo miosina - ADP- P_i y acelerando la liberación de los productos. En ese momento la actomiosina se une al ATP provocando la disociación de la actina y de la miosina. El complejo resultante ATP - miosina está dispuesto para otro ciclo de catálisis. Estas reacciones, como las de todas las ATPasas conocidas, requieren Mg^{2+} .

La miosina está formada por dos cabezas globulares unidas a una cola en forma de - hélices superenrolladas

La miosina es una proteína grande (520 kd) formada por 6 cadenas polipeptídicas: cada dos cadenas pesadas idénticas (220 kd cada una) y dos parejas de cadenas ligeras (de unos 20 kd cada una). Las micrografías electrónicas muestran que la miosina consta de una región globular en forma de doble cabeza, unida a una varilla extraordinariamente larga. La varilla está formada por un α -helicoide de dos hebras enrolladas entre sí y que corresponden a las cadenas pesadas. La cadena pesada de cada cabeza está unida a dos cadenas ligeras distintas. Estas tienen función moduladora y por motivos históricos reciben el nombre de cadena ligera esencial (ELC) y cadena ligera reguladora (RLC).

El estudio de los fragmentos de miosina producidos mediante proteólisis parcial ha permitido dilucidar la función de esta molécula proteica tan grande. La fragmentación proteolítica es un método que suele ofrecer resultados satisfactorios, como quedó demostrado por la ruptura de los anticuerpos en los fragmentos F_{ab} y F_c . De hecho, la ruptura de la miosina en fragmentos activos se realizó antes. La miosina puede ser dividida por la tripsina en dos fragmentos parcialmente funcionales, denominados meromiosina ligera (LMM) y meromiosina pesada (HMM). La LMM, al igual que la miosina, forma filamento pero carece de actividad ATPasa y no se une a la actina. La meromiosina pesada, por el contrario, cataliza la hidrólisis de ATP y se une a la actina, pero no forma filamentos. La HMM todavía se puede cortar más en dos subfragmentos globulares (llamados S1) y un subfragmento en forma de bastoncillo (llamado S2). S1 contiene un centro activo de ATPasa, un centro de unión a la actina y dos centros de unión a las cadenas ligeras. De hecho, los subfragmentos S1 son las unidades generadoras de fuerza de la miosina.

Recientemente, Ivan Raymont y sus colaboradores han determinado la estructura tridimensional de S1 con una resolución de 2,8 Å. S1 tiene una longitud de 165 Å, una anchura de 65 Å y un grosor de 40 Å. La cadena pesada de S1 contiene un segmento N-terminal de 25 kd, un segmento central de 50 kd y un segmento C-terminal de 20 kd. El centro activo de la ATPasa está formado por los segmentos de 25 kd y 50 kd, mientras que el centro de unión a la actina está formado por los segmentos de 50 kd y 20 kd. Casi todas las miosinas conocidas contienen la misma secuencia catalítica:

Gly - Glu - Ser - Gly - Ala - Gly - Lys - Thr

que es semejante a las secuencias encontradas en el centro activo de otras ATPasas. Las cadenas ligeras rodean al segmento de 20 kd, que forma un α -helicoide de 85 Å de longitud que prácticamente atraviesa S1 de lado a lado.

Las dos cabezas S1 se unen mediante una bisagra a la varilla de la miosina, que está formada por dos hebras helicoidales enrolladas mutuamente. La existencia de esta varilla tan larga (1700 Å ó 170 nm) se ve favorecida por la ausencia de prolina en un tramo de más de mil residuos y por la abundancia de leucina, alanina y glutamato. Las dos hebras están orientadas en la misma dirección. Sus ejes están separados unos 10 Å, lo que posibilita que las cadenas laterales de las dos hebras interactúen íntimamente para reforzar la estructura helicoidal. La regularidad de la secuencia de aminoácidos de la varilla favorece la formación de α -helicoides enrollados. La varilla está formada por unidades repetitivas de 7 residuos de aminoácidos (abcdefg), de los cuales a y d son normalmente hidrofóbicos. Los residuos a y d forman un patrón en zig-zag de salientes y entrantes que encajan con los de la otra hebra, de modo que se forma un núcleo hidrofóbico fuertemente ajustado. Por el contrario, los residuos b, c y f, localizados en la periferia del helicoide enrollado, tienden a estar cargados eléctricamente.

Estas estructuras se denominan, de forma gráfica, filamentos decorados. El eje longitudinal de S1 se inclina unos 45 grados con respecto al eje del helicoide de F actina. Las flechas de un filamento decorado apuntan siempre en la misma dirección en toda su longitud. Así pues, todas las unidades de actina de un filamento delgado tienen la misma direccionalidad.

La polaridad de los filamentos gruesos y delgado se invierte en la mitad del sarcómero

Un filamento grueso obtenido a partir del músculo tiene un diámetro de 16 nm (160 Å) y una longitud de 1,5 µm (15 000 Å). de estos filamentos sobresalen puentes cruzados en una disposición helicoidal regular, a intervalos de 14,3 nm a lo largo del eje del filamento, debido a la regularidad de la secuencia de aminoácidos de la varilla de miosina. En la zona media del filamento grueso hay una región de unos 150 nm desprovista de puentes cruzados proyectantes. Las moléculas de miosina situadas a un lado de la zona vacía apuntan en una dirección, mientras que las del otro lado apuntan en la dirección opuesta. Así pues, un filamento grueso es bipolar, mientras que un filamento delgado es unipolar.

En el músculo desprovisto de ATP los puentes cruzados decoran los filamentos delgados, de modo que las puntas de flecha de todos los filamentos señalan la dirección contraria de la línea Z. Así pues, todos los filamentos señalan la dirección contraria de la línea Z. Así pues, todos los filamentos delgados, situados a un lado de la línea Z, tienen la misma orientación, mientras que los del lado opuesto poseen polaridad inversa. La polaridad estructural de los filamentos, tanto delgados como gruesos, es crucial para un desplazamiento coherente. La fuerza de deslizamiento desarrollada por la interacción de unidades individuales de actina y miosina se suma, porque las unidades que interaccionan poseen la misma orientación relativa. Además, la dirección absoluta de las moléculas de actina y miosina se invierte a mitad de camino entre las líneas Z. En consecuencia, los dos filamentos delgados que se unen a los puentes cruzados de un filamento grueso son empujados el uno hacia el otro, de modo que la distancia entre las líneas Z disminuya.

La actina se polimeriza formando filamentos delgados

La actina, una proteína universal de los eucariotas, es el constituyente principal de los filamentos delgados. En disoluciones de baja fuerza iónica, la actina es un monómero de 42 kd, llamado actina - G a causa de su forma globular. A medida que se aumenta la fuerza iónica hasta el nivel fisiológico, la actina -g se polimeriza en una forma fibrosa llamada actina-F, que se parece mucho a los filamentos delgados del músculo intacto. La actina, al igual que la miosina, es una ATPasa. Sin embargo, la hidrólisis del ATP debida a la actina no provoca la contracción muscular. El ciclo ATP-ADP de la actina participa más bien en la formación y destrucción de los filamentos.

Wolfgang Kabsch y Kenneth Holmes han resuelto las estructuras de la actina -G y de la actina-F. la actina -g es una proteína bilobular. El ATP (o el ADP) se une a una hendidura localizada entre los dos dominios del monómero. En la actina-F, cada monómero se orienta respecto al siguiente mediante un giro de 166 grados y un desplazamiento de 27,5 Å, lo que le confiere el aspecto de una doble hebra. De hecho, en las micrografías electrónicas los filamentos delgados se parecen a dos collares de perlas enrollados entre sí. En el filamento, cada monómero está en contacto con otros cuatro, lo que explica el alto grado de cooperatividad de la polimerización. Cuando los monómeros de actina alcanzan la concentración crítica comienza el ensamblaje de los filamentos; siendo este valor 20 veces menor para la ATP-actina que para la ADP-actina.

Si se añade S1 (o miosina) a los filamentos de actina-F (filamentos delgados) en ausencia de ATP, aparece una estructura peculiar a base de puntas de flecha.

Estas estructuras se denominan, de forma gráfica, filamentos decorados. El eje longitudinal de S1 se inclina unos 45 grados con respecto al eje del helicoide de F- actina. Las flechas de un filamento decorado apuntan siempre en la misma dirección en toda su longitud. Así pues, todas las unidades de actina de un filamento delgado tienen la misma direccionalidad.

La polaridad de los filamentos gruesos y delgados se invierte en la mitad del sarcómero

Un filamento grueso obtenido a partir del músculo tiene un diámetro de 16 nm (160 Å) y una longitud de 1,5 µm (15 000 Å). de estos filamentos sobresalen puentes cruzados en una disposición helicoidal regular, a intervalos de 14,3 nm a lo largo del eje del filamento, debido a la regularidad de la secuencia de aminoácidos de la varilla de miosina. En la zona media del filamento grueso hay una región de unos 150 nm desprovista de puentes cruzados proyectantes. Las moléculas de miosina situadas a un lado de la zona vacía apuntan en una dirección, mientras que las del otro lado apuntan en la dirección opuesta. Así pues, un filamento grueso es bipolar, mientras que un filamento delgado es unipolar.

En el músculo desprovisto de ATP los puentes cruzados decoran los filamentos delgados, de modo que las puntas de flecha de todos los filamentos señalan la dirección contraria de la línea Z. Así pues, todos los filamentos delgados, situados a un lado de la línea Z, tienen la misma orientación, mientras que los del lado opuesto poseen polaridad inversa. La polaridad estructural de los filamentos, tanto delgados como gruesos, es crucial para un desplazamiento coherente. La fuerza de deslizamiento desarrollada por la interacción de unidades individuales de actina y miosina se suma, porque las unidades que interactúan poseen la misma orientación relativa. Además, la dirección absoluta de las moléculas de actina y miosina se invierte a mitad de camino entre las líneas Z. En consecuencia, los dos filamentos delgados que se unen a los puentes cruzados de un filamento grueso son empujados el uno hacia el otro, de modo que la distancia entre las líneas Z disminuya.

El impulso que origina la contracción se debe a cambios conformacionales en la cabeza S1 de la miosina

¿Cómo puede la formación y la disociación de complejos entre la actina y S1 provocar el deslizamiento de los filamentos delgados y gruesos? La figura muestra un posible mecanismo generador de fuerza, reconstruido a partir de muchos experimentos, tanto bioquímicos como biofísicos y estructurales. El ciclo ATP-ADP de la miosina podría generar movimiento direccionado del siguiente modo:

1. Las cabezas S1 del músculo en reposo no interaccionan con las unidades de actina debido al impedimento estérico de la tropomiosina, una proteína reguladora. En este estado, los productos de la hidrólisis del ATP (ADP y P_i) siguen unidos a la miosina.
2. Cuando se estimula el músculo, la tropomiosina cambia de posición. En este momento, las cabezas S1 pueden separarse del filamento grueso y unirse a las unidades de actina del filamento delgado (B).
3. La unión del complejo miosina -ADP- P_i a la actina provoca la liberación de P_i . La posterior liberación del ADP genera un cambio conformacional importante en S1 (C). El cambio de orientación de S1 con respecto a la actina constituye el impulso o golpe de potencia de la contracción muscular: el filamento delgado se mueve una distancia de unos 100 Å. La disociación del ADP de la miosina tiene lugar en la fase final del golpe de potencia.
4. A continuación, la unión del ATP a la miosina provoca la rápida disociación de la actina. La cabeza S1 vuelve a estar separada del filamento delgado (D).
5. Por último, el ATP unido se hidroliza por la acción de la cabeza libre de la miosina, con lo que ya está en disposición para volver a interaccionar con el filamento delgado (E).

La parte esencial del proceso es un cambio cíclico tanto en la forma de la cabeza S1 de la miosina como en su afinidad por la actina. La unión del ATP al centro catalítico próximo al centro de S1 provoca la separación de S1 de la actina en un lugar más alejado. S1 está diseñado de modo para poder unirse fuertemente al ATP o a la actina, pero no a ambos a la vez. Puestos a elegir, S1 prefiere claramente el ATP a la actina. Una vez unido el ATP, la hendidura del centro activo se cierra en torno a ese ATP. El cierre de la hendidura y la posterior hidrólisis del ATP provocan desplazamientos de los dominios que cambian la curvatura de S1. La liberación del fosfato y, asociada a la unión de S1 sufre otro cambio. El resultado de cada ciclo ATP-ADP es un desplazamiento de unos 100 Å (10 nm) del filamento delgado respecto al filamento grueso.

Hay que destacar el hecho de que la miosina no hidroliza ATP a una velocidad apreciable si no interacciona con la actina. De este modo se evita que el ATP se hidrolice de forma inútil. Recordemos que las bombas impulsadas por el ATP. Como por ejemplo la Na^+-K^+ ATPasa, tampoco hidrolizan al ATP cuando no realizan trabajo útil. Otro aspecto destacable es que la afinidad de la actina hacia la miosina depende de la naturaleza del nucleótido unido. La actina interacciona fuertemente con la miosina cuando la miosina se encuentra unida al ADP o cuando su centro de unión a nucleótidos está vacío. Por el contrario, la actina se une débilmente al complejo miosina - ATP. El control de las interacciones proteína - proteína por medio de nucleótidos unidos es un tema recurrente en bioquímica. En un capítulo anterior, vimos como la unión del GTP a la transducina, una proteína amplificadora en el mecanismo de la visión, provoca su disociación de la rodopsina fotoexcitada.

La molécula de miosina posee dos clases de bisagras que permiten a la cabeza S1 unirse y liberarse reversiblemente de la actina y cambiar su orientación cuando está unida. Una clase de bisagra está situada entre la cabeza S1 y la varilla S2, y la otra clase está entre la varilla S2 y la unidad LMM de la miosina. Estas bisagras son regiones flexibles de la cadena polipeptídica, vulnerables a la escisión por acción de enzimas proteolíticas. Realmente, la ruptura enzimática de la miosina en los fragmentos LMM, S2 y S1 es una prueba del hecho de que la miosina está estructurada en zonas o dominios conectados por bisagras. La bisagra situada entre S1 y S2 posibilita a S1 interaccionar con la actina, de una manera cuando está unida al ADP, y de otra diferente cuando lo libera. La otra bisagra, situada entre S2 y LMM, permite una considerable variación en la posición de S1 con respecto al filamento grueso, lo que permite a S1 interaccionar con precisión con la actina.

Esferas recubiertas con miosina de desplazan unidireccionalmente a lo largo de cables de actina orientados

Uno de los objetivos de la investigación bioquímica es reconstruir las funciones biológicas in vitro utilizando componentes purificados. La reconstitución pone a prueba nuestro conocimiento de los procesos biológicos. Además, los sistemas reconstituidos son muy apropiados para realizar estudios mecanísticos gracias a su relativa simplicidad. Ya hemos estudiado previamente sistemas reconstituidos que llevan a cabo procesos tales como el bombeo de iones impulsado por el ATP y el transporte de protones impulsado por la luz. Un sistema de ensayo para la observación directa del movimiento inducido por las interacciones entre la miosina y la actina ha sido diseñado por Michael Sheetz y James Spudich. Estos utilizaron Nitella, un alga gigante que contiene cables de actina fijados a la cara citoplasmática de una sfilas de cloroplastos. Un aspecto fundamental de estos cables, que son mediadores de la corriente citoplasmática, es que tienen filamentos de actina orientados en la misma dirección. El hallazgo llamativo fue que unas esferas recubiertas con miosina se desplazaban unidireccionalmente a lo largo de estos cables de actina, en presencia de ATP, en la misma dirección en que se movía la corriente citoplasmática del citosol. Las esferas recubiertas con miosina del músculo esquelético se desplazaban a la velocidad de 5 $\mu\text{m/s}$, que es aproximadamente la velocidad de contracción de los sarcómeros intactos in vivo. Se ha calculado que 25 cabezas de miosina en cada esfera provocaban este desplazamiento. En esencia, las moléculas de miosina "se pasean" sobre los cables de actina. Alternativamente, los filamentos de actina pueden desplazarse sobre una superficie de cristal que tenga moléculas de miosina adheridas, siempre que el ATP esté presente.

La velocidad del desplazamiento depende del tipo de miosina utilizado en el ensayo, no del tipo de actina. La miosina del músculo liso se desplaza a 0,4 $\mu\text{m/s}$ y la miosina de Dictyostelium a 1 $\mu\text{m/s}$, considerablemente más despacio que la miosina del músculo esquelético, que también es el sistema más rápido in vivo. Por consiguiente, la velocidad depende de la naturaleza del motor (miosina), no del carril (actina). Además, la meromiosina pesada se desplaza prácticamente a la misma velocidad que la miosina intacta, indicando este hecho que el segmento distal de 85 nm de la cola de la miosina no participa en la generación de la fuerza contráctil. De hecho, los filamentos de actina se deslizan también sobre películas recubiertas con cabezas S1. Así pues, ninguna porción de la cola α -helicoidal de la miosina es esencial para su movimiento. La fuerza de la contracción muscular se genera dentro de las cabezas S1.

Este sistema que exhibe movilidad in vitro ofrece la posibilidad de observar directamente las distintas etapas del comportamiento de una única molécula de miosina. Para poder diferenciar cada una de estas etapas de movimiento browniano al azar, el sistema necesita una mejora adicional. Las esferas pueden inmovilizarse en disolución mediante el uso de rayos láser intensamente enfocados a modo de trampas ópticas. Un filamento de actina con una esfera en cada extremo puede colocarse cerca de una molécula de miosina que emerge de una superficie. De esta forma se puede detectar el movimiento del filamento. El desplazamiento medio de cada etapa es de unos 11nm, lo que apoya firmemente el modelo de los puentes cruzados oscilantes para la contracción muscular. Además el valor medio de la fuerza que ejerce una única molécula de miosina es de unos 4 piconewtons (pN). La dependencia de la duración del proceso y de la fuerza de la concentración de ATP sugiere que en cada ciclo de los puentes cruzados se hidroliza un ATP.

La troponina y la tropomiosina intervienen en la regulación de la contracción muscular por el ION calcio

¿Cómo se regula la contracción muscular?

En el músculo en reposo, el complejo ADP - Pi - miosina está en disposición de unirse a la actina, pero la formación de contactos productivos está restringida. ¿Cuál es la naturaleza de este impedimento y cómo se evita? Setsuro Ebashi observó que el control sobre la actina y la miosina lo ejercen la tropomiosina y el complejo de troponina cuando el nivel de calcio en el citosol es bajo. Su efecto inhibitor desaparece cuando el nivel de calcio aumenta de forma transitoria. En el músculo en reposo (relajado), el Ca^{2+} queda secuestrado en el retículo sarcoplásmico (SR), un extenso compartimiento intracelular, mediante un sistema de transporte activo. Las bombas impulsadas por el ATP de la membrana del SR disminuyen la concentración de Ca^{2+} en el citosol por debajo de $1\mu\text{M}$. Un impulso nervioso provoca la liberación del Ca^{2+} de los sacos del retículo sarcoplásmico, por lo que la concentración citosólica alcanza el valor de $10\mu\text{M}$ y se produce la contracción muscular.

La tropomiosina y el complejo de troponina están localizados en el filamento delgado y constituyen aproximadamente un tercio de su masa. La tropomiosina es un bastoncillo α -helicoidal de dos hebras. Esta proteína de 70 kd, de forma muy alargada, está orientada casi paralelamente al eje longitudinal del filamento delgado. La troponina es un complejo de tres cadenas polipeptídicas: TnC (de 18 kd), TnI (de 24 kd) y TnT (de 37 kd). La TnC se une a los iones calcio, la TnI se une a la actina y la TnT a la tropomiosina. El complejo de la troponina queda localizado en los filamentos delgados a intervalos de 385 Å, período establecido por la longitud de la tropomiosina. Cada complejo de troponina regula, a través de la tropomiosina, la actividad de unos siete monómeros de actina. Cuando la concentración de calcio en el citosol es baja inhibe la contracción muscular, pero cuando es alta no lo hace.

La troponina C, el componente del complejo que es sensible al calcio, consta de dos dominios homólogos. Los dominios globulares amino terminal y carboxilo terminal están conectados por una larga α -hélice de ocho vueltas. Cada dominio contiene dos centros de unión para el Ca^{2+} . Los dos del dominio carboxilo-terminal tienen una elevada afinidad para este ion ($K = 0,1\mu\text{M}$), mientras que los centros del dominio amino-terminal presentan una afinidad baja ($K = 10\mu\text{M}$). TnC es un miembro de una superfamilia de proteínas que se unen al calcio; la superfamilia mano EF, estudiada en un capítulo anterior. La estructura de la TnC es muy parecida a la de la calmodulina, una proteína omnipresente sensible al calcio.

En el músculo en reposo los centros de alta afinidad de TnC están ocupados por Ca^{2+} , pero los de baja afinidad están vacíos. El Ca^{2+} ocupa los centros de baja afinidad al ser liberado del retículo sarcoplásmico, con lo que la conformación del dominio amino-terminal cambia y se vuelve semejante a la del dominio carboxilo-terminal. Este cambio conformacional en la TnC se transmite a los otros componentes del complejo de la troponina y después a la tropomiosina. Parece como si la TnT, que tiene una forma muy alargada, controlase la posición de la tropomiosina sobre el filamento delgado, cerca de la interfase entre la actina y las cabezas S1 de la miosina. Cuando la concentración de calcio es baja, la tropomiosina bloquea estéricamente la unión de S1 a la actina.

La importancia de las proteínas troponina y tropomiosina en la regulación de la contracción queda demostrada de forma muy gráfica en los experimentos de motilidad in vitro. El desplazamiento de esferas recubiertas de miosina sobre cables de actina es insensible al Ca^{2+} cuando están presente sólo estas dos proteínas. La adición de troponina y tropomiosina hace que las esferas respondan al Ca^{2+} . Cuando falta el Ca^{2+} , el desplazamiento queda bloqueado y puede restablecerse al añadir niveles micromolares de este ion. Así pues, un sistema reconstituido conteniendo solamente cuatro proteínas miosina, actina, troponina y tropomiosina mani fiesta un movimiento regulado por el calcio. Resulta pues evidente que el Ca^{2+} controla la contracción muscular por un mecanismo alostérico en el que flujo de información transcurre así:

$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{troponina} \rightarrow \text{tropomiosina} \rightarrow \text{actina} \rightarrow \text{actina} \rightarrow \text{miosina}$

La actina y la miosina tienen funciones contractiles en prácticamente todas las células eucarióticas

Se sabe desde hace tiempo que muchas células no musculares pueden desplazarse y cambiar de forma. La migración de las células en el desarrollo de los embriones, el desplazamiento de los macrófagos hacia los tejidos lesionados y la retracción del coágulo por acción de las plaquetas son ejemplos ilustrativos de la universalidad del movimiento celular. ¿Cuál es el fundamento molecular del movimiento celular? Una de las primeras pistas se obtuvo a partir de estudios realizados en *Physarum polycephalum*, un moho del limo de tipo plasmodial que contiene una masa fluida de citoplasma. Extractos obtenidos a partir de estas células primitivas tenían propiedades análogas a las de la actomiosina del músculo estriado. La adición de ATP provocaba una rápida disminución de la viscosidad, seguida de un lento aumento de la misma a medida que se hidrolizaba el ATP. Además, este moho del limo contenía gran cantidad de actina, que era muy semejante a la actina muscular. Esta actina forma filamentos delgados que interaccionan con la miosina. Olo más que extraordinario es que la actina del moho del limo reacciona con las cabezas S1 del músculo esquelético de vertebrados para formar filamentos decorados, como los que forman la actina y la miosina de los vertebrados. De hecho, la actina del moho sólo se diferencia de la actina del músculo de conejo en 17 de los 375 residuos de aminoácidos. Así pues, la actina del músculo de conejo en 17 de los 375 residuos de aminoácidos. Así pues, la actina es una antigua proteína de los eucariotas, tenazmente conservada.

De manera análoga, se ha aislado miosina de este moho y de otras muchas células eucarióticas. Las miosinas presentan una diversidad mucho mayor que la actina. En células no musculares, se han encontrado dos clases de miosinas. Las moléculas de miosina I tienen una sola cabeza, mientras que las moléculas de miosina II tienen, al igual que la miosina del músculo, dos cabezas. La cabeza de la miosina I contiene un centro de unión para el ATP y otro para la actina, al igual que la miosina II. Sus secuencias de aminoácidos presentan una homología del 40%. La miosina I contiene al menos una cadena ligera, mientras que cada cabeza de la miosina II se asocia a dos cadenas ligeras. La miosina I carece de la larga α -hélice enrollada de la miosina II, por lo que no puede formar filamentos bipolares. Por el contrario, la miosina I posee un dominio carboxilo-terminal que se une a lípidos y que posibilita su asociación con las membranas. La miosina I puede transportar orgánulos rodeados de membrana a lo largo de carriles de actina. En células no musculares, los α -helicoides enrollados de las moléculas de miosina II determinan el tipo de mercancía que va a ser transportado por la máquina. El ensamblaje y las propiedades funcionales de las miosinas de células no musculares se controla mediante la fosforilación de los residuos de serina y treonina de sus colas.

Las oscilaciones de cilios y flagelos se producen por el deslizamiento de los microtubulos inducido por dineína

Las células eucarióticas tienen un andamiaje interno llamado citoesqueleto que les confiere su forma característica. El citoesqueleto también es responsable de que las células puedan transportar vesículas, cambiar de forma, o migrar de un sitio a otro. Esta estructura dinámica consta de 3 tipos de asociaciones filamentosas: los microfilamentos, los filamentos intermedios y los microtubulos. Como ya hemos comentado, los microfilamentos (de unos 7 nm de diámetro) están formados por actina. Los filamentos intermedios (cuyo diámetro oscila entre 7 y 11 nm) se encuentran en las células epiteliales de los animales, y están compuestos por un núcleo de α -helicoides de doble o triple hebra superenrollados seguidos a cada lado por secuencias diversas. Las queratinas del pelo son un ejemplo representativo de proteínas de los filamentos intermedios.

Los microtubulos, el tercero de los componentes del citoesqueleto, son estructuras cilíndricas huecas, formadas por dos clases de subunidades proteicas semejantes de 50 kD, la α y la β -tubulina. Su diámetro externo de unos 30 nm los diferencia claramente de los microfilamentos y los filamentos intermedios. La pared rígida de los microtubulos está formada por una organización helicoidal de subunidades alternantes de α y β -tubulina. Un microtúbulo puede considerarse constituido por trece protofilamentos que corren paralelos a su eje longitudinal.

Los microtubulos son los componentes principales de los cilios y flagelos de los eucariotas. Estos orgánulos sobresalen de la superficie de muchas células y tienen el aspecto de un pelo o cabello. Los cilios actúan como remos que desplazan una corriente de líquido paralelamente a la superficie celular estacionaria. Así, por ejemplo, las oscilaciones coordinadas de los cilios situados en las células que recubren el aparato respiratorio sirven para expulsar las partículas extrañas. Las células libres, tales como espermatozoides y protozoos, están propulsadas o bien por cilios o bien por flagelos. Los estudios de microscopía electrónica han revelado que los cilios y flagelos de prácticamente todos los eucariotas tienen el mismo diseño fundamental: un haz de fibras, llamado axonema, rodeado por una membrana que es continuación de la membrana plasmática. De hecho, las fibras del axonema son microtubulos: un grupo periférico de nueve pares de microtubulos rodea a dos microtubulos simples. Este diseño es muy frecuente, y se denomina ordenación (9+2). Los flagelos se distinguen de los cilios en que son mucho más largos.

Un diagrama esquemático de la estructura de un axonema. Cada uno de los nueve dobletes externos tienen la forma de un ocho, con unas dimensiones de 37 nm x 25 nm. La menor de las fibras del par, la subfibra A, está unida a la envoltura central del cilio mediante espículas radiales. Los dobletes del microtúbulo son mantenidos juntos por eslabones de nexina. De cada subfibra A surgen dos brazos. En un cilio determinado, todos los brazos apuntan en la misma dirección. Tratando los cilios con detergente y después con una disolución salina concentrada, se elimina la membrana plasmática que los rodea y se solubiliza una ATPasa llamada dineína. Las fibras externas retienen su ordenación cilíndrica noagonal, pero carecen de brazos. Estos pueden restablecerse por adición de dineína, en condiciones iónicas adecuadas. Así pues, los brazos de las subfibras A están formados por la dineína con actividad ATPasa. En ausencia de ATP los brazos de dineína se unen fuertemente a la subfibra B.

La dineína es una proteína muy grande que contiene una dos o tres cabezas dependiendo de su origen, y múltiples polipéptidos asociados. Una dineína de 1000 a 2000 kD tiene una masa parecida a la de un ribosoma completo. La región de la cabeza, como en el caso de la miosina, actúa como un puente cruzado. La secuencia de aminoácidos de la dineína no se parece a la de la miosina. Aunque su ciclo ATPasa es similar. La unión de ATP a la dineína libera a ésta de la subfibra B. La hidrólisis del ATP unido origina el complejo dineína ADP-P_i, que se une de nuevo a la subfibra B. La asociación de la dineína con la subfibra B induce la liberación de P_i tal como ocurría en el músculo cuando S1 se enlazaba con la actina. El golpe de potencia tiene lugar probablemente en esta etapa.

¿Cómo puede el ciclo ATPasa de la dineína hacer oscilar los cilios y flagelos? Peter Satir y Ian Gibbons demostraron que los dobletes externos del axonema se deslizan uno respecto al otro para producir la flexión. La fuerza entre los dobletes adyacentes es generada por los puentes cruzados de dineína. Los brazos de dineína de la subfibra A de un doblete se mueven a lo largo de la subfibra B del doblete adyacente a medida que el ATP se hidroliza, del mismo modo que se desplazaban los puentes cruzados de la miosina sobre el filamento de actina del músculo esquelético. En un cilio intacto, las espículas radiales se resisten a este deslizamiento, lo que provoca a su vez una flexión localizada. La nexina, una proteína muy elástica, mantiene juntos a los dobletes adyacentes durante el proceso de deslizamiento. Una diferencia importante entre el músculo y los cilios es que en el músculo la miosina forma filamentos bipolares que

enlazan transversalmente los filamentos de actina antiparalelos, mientras que en los cilios la dineína dirige el deslizamiento de los microtúbulos adyacentes paralelos. En consecuencia, el sarcómero se acorta pero el axonema se dobla.

En un grupo de pacientes con enfermedades pulmonares crónicas se han encontrado cilios defectuosos. Bjorn Afzelius demostró que los cilios del aparato respiratorio de estos enfermos carecían de movimiento. Los varones con ese defecto genético eran además estériles porque sus espermatozoides no podían desplazarse. Esta enfermedad, denominada síndrome de los cilios inmóviles puede originarse a partir de distintas lesiones moleculares. La más frecuente es la carencia de los brazos de dineína externos e internos. Otros defectos que producen la misma enfermedad son la carencia de espículas radiales, de eslabones de nexina o de los microtúbulos centrales. Un hallazgo inesperado fue que muchos pacientes con cilios inmóviles presentaban una inversión izquierda - derecha completa de sus órganos internos (situs inversus), lo que sugiere que la organización de los microtúbulos juega un papel crítico en el establecimiento de la asimetría izquierda derecha en las primeras fases de la embriogénesis.

La rápida asociación y disociación de los microtúbulos dirigida por el GTP es esencial para la morfogénesis

Los microtúbulos son también importantes en la determinación de la forma de las células y en la separación de los cromosomas hijos durante la mitosis. Los microtúbulos de las células están formados por agregación de moléculas de α y β -tubulina sobre filamentos preexistentes o centros de nucleación. La polimerización de novo es muy lenta porque requiere la confluencia simultánea de múltiples subunidades.

Para constituir una hélice de trece protofilamentos. En cambio, los microtúbulos de las células arrancan de los centrosomas y de los polos del huso mitótico. Estos centros de iniciación del crecimiento del microtúbulo se llaman centros organizadores de microtúbulos (MTOC). El extremo negativo del microtúbulo es el que se une al MTOC, mientras que el extremo positivo está libre.

De hecho, la mayor parte de los microtúbulos sufren una rápida asociación y disociación. Las tubulinas fluorescentes inyectadas en las células se incorporan al huso mitótico en unos 15 segundos y a los otros microtúbulos en varios minutos. El secreto del rápido recambio de los microtúbulos es la hidrólisis de GTP unido a la tubulina. La concentración crítica para la formación de los microtúbulos es mucho menor para la GTP - tubulina que para la GDP - tubulina. La GTP - tubulina se adhiere al extremo positivo de los microtúbulos. Unos segundos después se hidroliza el nucleótido unido. El complejo GDP tubulina integrado en el microtúbulo permanece allí, pero si está situado en el extremo libre se disocia del filamento. Por consiguiente, cuando la velocidad de adición de GTP - tubulina en el extremo positivo es más rápida que la velocidad de hidrólisis del GTP enlazado, el microtúbulo crece en longitud. Mare Kirschner y Tim Mitchison encontraron que en una población de filamentos algunos microtúbulos se alargaban, al tiempo que otros se acortaban. Esta propiedad, denominada inestabilidad dinámica, es fruto de las fluctuaciones al azar que dependen de que el extremo positivo contenga GTP tubulina o GDP - tubulina.

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos resulta útil en el desarrollo celular. La formación del huso mitótico es un ejemplo muy instructivo de ello. Los microtúbulos conectan cada uno de los polos del huso mitótico a los cinetócoros, los centros de unión localizados en los centrómeros de los cromosomas hijos. Los centros de nucleación situados en los dos polos no envían de forma direccional los microtúbulos hacia los cinetócoros, sino que de los polos emanan centenares de microtúbulos hacia los cinetócoros, sino que de los polos emanan centenares de microtúbulos orientados al azar. Los microtúbulos que logran alcanzar a los cinetócoros se estabilizan, mientras que los demás se desintegran, porque tienen sus extremos positivos protegidos. Así pues, la inestabilidad dinámica produce una gran colección de estructuras semejantes y sólo se estabilizan las que están comprometidas en interacciones constructivas. Vemos aquí, al igual que en las actuaciones del sistema inmune, la importancia de la selección a la hora de elegir un patrón basado en variaciones al azar.

La colchicina, un alcaloide del azafrán de otoño, inhibe los procesos celulares que dependen del funcionamiento de los microtúbulos porque bloquea su polimerización. Así, por ejemplo, las células en división se detienen en la metafase por acción de la colchicina, porque los microtúbulos son esenciales para el desplazamiento de los cromosomas. La colchicina también inhibe el movimiento de las moléculas a lo largo de los microtúbulos; por eso muchos procesos de secreción son bloqueados por este compuesto. La colchicina es un potente agente antiinflamatorio que se ha utilizado durante siglos para tratar los ataques agudos de gota. El taxol, que se extrae de la corteza del tejo del Pacífico, provoca el efecto contrario: estabiliza los microtúbulos de tubulina y estimula la polimerización. El taxol es un fármaco anticancerígeno, ya que impide la proliferación de las células que se dividen rápidamente porque interfiere con el huso mitótico.

La quinesina desplaza las vesículas y orgánulos unidireccionalmente a lo largo de los microtúbulos

Los microtúbulos también participan en el movimiento de las vesículas y orgánulos, presentes en prácticamente todas las células eucarióticas. El desarrollo de la microscopía de contraste, mejorada con video, ha permitido visualizar el movimiento in vivo de vesículas de 30 nm. El transporte de las vesículas es muy llamativo en las neuronas, en las que tiene lugar con gran rapidez y a considerable distancia. Las vesículas se desplazan desde el cuerpo celular hacia la terminal nerviosa a velocidades que alcanzan desde el cuerpo celular hacia la terminal nerviosa a velocidades que alcanzan los 5 $\mu\text{m/s}$, lo que les permite recorrer la distancia de un metro en un día. Se ha constatado que las vesículas también se mueven rápidamente en el axoplasma alejado (el citoplasma de los axones nerviosos). Los raíles de estos movimientos son microtúbulos sencillos.

El desarrollo de un sistema reconstituido in vitro capaz de transportar vesículas ha llevado al descubrimiento de una nueva máquina molecular dirigida por ATP. Las vesículas y orgánulos son transportados por la quinesina, una gran proteína hidrosoluble formada por dos subunidades de 110 kd y otras de dos de 70 kd. La quinesina es una proteína muy alargada de unos 110 nm de longitud. El dominio globular amino terminal de cada cadena pesada contiene un centro de unión al ATP y otro de unión a los microtúbulos. Este dominio motor está unido a un tallo formado por α -hélices enrolladas. La región carboxilo terminal, junto con las cadenas ligeras, se une a receptores específicos de la membrana de las vesículas o de los orgánulos. De esta forma, un extremo de la quinesina se une al microtúbulo y el otro "engancha" la mercancía que va a ser transportada. Observaciones de los desplazamientos de orgánulos asimétricos, así como de las mitocondrias, indican que éstos, por medio de las moléculas de quinesina, son izados y empujados a lo largo de los microtúbulos en lugar de rodar sobre ellos.

Los orgánulos y vesículas que contienen quinesina se desplazan desde el extremo negativo del microtúbulo (el que está asociado a centros organizadores de microtúbulos, como el centrosoma) hacia el extremo positivo. Por tanto, la quinesina provoca desplazamientos desde el centro de la célula hacia la periferia (transporte anterógrado). Las esferas recubiertas de quinesina se mueven en la misma dirección que las vesículas. La actividad ATPasa de la quinesina se estimula 50 veces cuando se le añaden microtúbulos, exactamente igual que se potenciaban las actividades ATPasa de la miosina por acción de los microfilamentos. La hidrólisis de ATP por la quinesina está estrechamente asociada a su unión con un microtúbulo y a la generación de fuerza. La quinesina se diferencia de la miosina y de la dineína en que el ATP promueve su unión a la proteína asociada en lugar de su separación. El ATP es hidrolizado por la quinesina mientras ésta unida al microtúbulo; la hidrólisis le permite a la quinesina disociarse y así poder avanzar otro paso en su recorrido sobre el microtúbulo. Por tanto, un motor puede tener mayor o menor afinidad por su proteína asociada cuando se hidroliza el ATP unido. En cualquier caso, la clave de la transducción de energía es el enorme cambio de afinidad mutua entre esta pareja de proteínas durante el ciclo ATP-ADP.

Otro tipo de motor transporta su mercancía desde la periferia de la célula hacia el centro (transporte retrógrado). La dineína citoplasmática, una proteína motirrelacionada con la dineína del axonema de cilios y flagelos, es el transportador retrógrado. La polaridad de los microtúbulos funciona como una brújula de navegación para el transporte de partículas en el citoplasma. La dirección del movimiento viene determinada por el motor, no por el carril.

Un único motor de quinesina es capaz de desplazar una vesícula a lo largo del microtúbulo

¿Cuántas moléculas de quinesina hacen falta para transportar una vesícula o un orgánulo? La respuesta a esta cuestión tan importante surge del análisis del movimiento de esferas revestidas de quinesina a lo largo de microtúbulos, y, a la inversa, del movimiento de microtúbulos sobre superficies de vidrio recubiertas de quinesina. Como ya hemos mencionado, se puede utilizar un rayo láser intensamente enfocado a modo de micromanipulador (pinzas ópticas) para colocar partículas en una posición determinada. Se colocaron esferas recubiertas por un pequeño número de moléculas de quinesina sobre un microtúbulo y se registraron sus movimientos. Se pudieron observar resultados diversos: (1) algunas esferas no se unieron a los microtúbulos; (2) algunas se unieron, recorrieron cierta distancia y, antes de llegar al extremo del microtúbulo, se disociaron; y (3) el resto recorrió toda la longitud del microtúbulo. Al analizar la relación entre estos resultados y el valor medio del número de moléculas de quinesina unidos a cada esfera, se demostró que una única molécula de quinesina puede desplazar una esfera a lo largo del microtúbulo. Análogamente, una única molécula de quinesina adsorbida en una superficie de vidrio puede mover un microtúbulo. Sin embargo, una partícula que contiene una única molécula de quinesina se aparta del carril cuando ha recorrido una distancia de 1 o 2 μm , debido a que en cada ciclo ATPasa la quinesina se disocia de forma transitoria de la tubulina. Una esfera que contenga dos moléculas de quinesina permanecerá sobre el carril más tiempo, ya que será menos probable que las dos quinesinas estén disociadas a la vez, y por consiguiente, la esfera recorrerá una distancia mayor. Por tanto, basta un número pequeño de moléculas de quinesina para transportar una vesícula largas distancia a lo largo de un microtúbulo. Mediante experimentos de trampa óptica se ha demostrado recientemente que la molécula de quinesina avanza 8 nm (80 Å) en cada paso, una distancia en consonancia con las dimensiones de esta proteína motriz.

El movimiento de filamentos recubiertos de actina sobre superficies de vidrio revestidas de miosina y el movimiento de microtúbulos sobre un revestimiento de quinesina difieren en un aspecto importante. Los filamentos de actina se desplazan con mayor rapidez sobre superficies con elevada densidad de miosina que sobre superficies con una baja densidad de miosina. Por el contrario, la velocidad a la que se desplazan los microtúbulos es independiente de la densidad de la quinesina. Esta diferencia se debe a que una molécula de miosina está la mayor parte del tiempo disociada de la actina, mientras que la quinesina está casi todo el tiempo firmemente unida al microtúbulo. Las propiedades cinéticas de la miosina han tenido que adaptarse al movimiento rápido, y este proceso se ve favorecido si los periodos de permanencia en contacto con la actina son breves. Por el contrario, la quinesina está diseñada para permanecer sobre el carril el mayor tiempo posible, de forma que aquellas vesículas que contenga un número pequeño de moléculas motrices puedan transportarse ininterrumpidamente, aunque a menor velocidad: éste es el precio que hay que pagar.

Las bacterias pueden nadar gracias a la rotación de sus flagelos

En un capítulo anterior, vimos que las bacterias se acercan a los atrayentes, y huyen de los repelentes. Pueden nadar gracias a la rotación de sus flagelos. Una bacteria de *Escherichia coli* o *Salmonella typhimurium* tiene unos seis flagelos que sobresalen en cualquier punto de su superficie celular. Estos delgados filamentos helicoidales tienen 15 nm de diámetro y una longitud de 10 µm, y están constituidos por subunidades de flagelina, de 53 kd. Cuando los flagelos giran en sentido antihorario, se forma un haz coherente que transmite la fuerza propulsora. El resultado es un avance suave y prácticamente en línea recta. Por el contrario, cuando los flagelos rotan en sentido horario, el haz se dispersa porque los filamentos helicoidales no se enroscan entre sí. Esta bacteria va dando tumbos hasta que inicia la rotación en sentido antihorario y empieza a nadar en una dirección concreta. Cuando una bacteria avanza en una dirección equivocada, el ir dando tumbos le permite reorientar su movimiento.

Las bacterias nadan a una velocidad de unos 25 µm/s, lo que equivale a 10 veces su longitud por segundo. Un atleta que corriera a una velocidad equivalente establecería un nuevo record al recorrer los 100 m lisos en 5,5 segundos. Además, las bacterias son excelentes nadadoras, ya que sus motores flagelares consumen menos del 1% del total de energía que producen. Este resultado es aún más sorprendente si se tiene en cuenta su pequeño tamaño en relación con la viscosidad del agua. Las bacterias no pueden dejarse llevar por la corriente ni siquiera durante un microsegundo. La resistencia que la viscosidad ofrece a las bacterias es parecida a la que encontraríamos si tratásemos de nadar en jarabe de melaza.

Un flagelo bacteriano, a diferencia de un cilio o flagelo eucariótico, es un apéndice extracelular que transmite la fuerza motriz, pero no la genera. La fuerza propulsora es generada por un motor localizado en el interior de la membrana citoplasmática de la célula. Los flagelos aunque inertes, son estructuras complejas. Estudios genéticos demuestran que están codificados por unos 40 genes. En cuanto al motor, está codificado únicamente por dos genes. *MotA* y *motB* ¿cómo funciona este motor? Una primera pista indicaba que no se requiere ATP para la rotación del flagelo. Por el contrario, todos los motores eucarióticos conocidos están dirigidos por ATP o por GTP. Una célula bacteriana desprovista de sus fuentes energéticas puede empezar a nadar si se la coloca en un medio que sea más ácido que su citosol. De hecho, la fuente de energía para la rotación de los flagelos es la fuerza promotriz establecida a ambos lados de la membrana citoplasmática. La magnitud de esta fuerza depende tanto del potencial de membrana como del gradiente de pH que se establecen a través de la membrana.

Los flagelos bacterianos giran normalmente a una velocidad de 100 revoluciones por segundo. Cada revolución está impulsada por el flujo de unos 1000 protones a través de la membrana. La fuerza rotacional se genera mediante la interacción entre las proteínas *motA* y *motB*, localizadas en la membrana citoplasmática para canalizar la fuerza promotriz. La proteína *motA* forma complejos que conducen los protones a través de esta membrana; estos conductos están unidos elásticamente a la pared celular. Las proteínas *motB* se sitúan en la periferia del anillo M, de forma que interactúan con *motA*.

¿Cómo puede el flujo de protones a través de un complejo de conductos producir el giro del anillo M que sustenta la varilla del flagelo? Howard Berg y sus colaboradores han propuesto un posible mecanismo. En su modelo, el anillo M contiene una serie de centros aceptores de protones (aportados por la proteína *motB*) que se sitúa en su periferia a intervalos regulares. Este anillo interactúa con ocho complejos de conductos formados por la proteína *motA*. Cada complejo de conductos contiene dos semiconductores: uno de ellos es accesible desde el citosol y el otro lo es desde el lado extracelular. Los semiconductos nunca establecen contacto entre sí. En lugar de ello, un semiconductor transfiere un protón a uno de los centros del anillo M. Este protón puede acceder al otro semiconductor si el anillo M gira.

¿Cómo puede el intercambio de protones entre *motA* y *motB* dirigir la rotación del anillo M? Supongamos que: (1) ninguno de los lados del complejo de conductos puede pasar de largo un centro aceptor de protones si éste está ocupado, y (2) el centro del complejo no puede pasar de largo un centro aceptor de protones si éste está vacío. Consideremos ahora el complejo de conductos representado en la parte A de la figura. Como el centro nº 2 está vacío y el nº 3 está ocupado, el complejo puede moverse hacia la derecha, pero no hacia la izquierda. Si un desplazamiento al azar lo traslada una posición más a la derecha, como se indica en (B), el protón del centro nº 3 puede acceder al citosol, y un protón del exterior puede entrar en el centro adyacente nº 4, que se encuentra vacío (C). Por último, el anillo M gira en sentido antihorario por aliberar la fuerza ejercida por la conexión elástica del complejo de conductos. La disposición del panel (D) es idéntica a la de (A), con la única diferencia de que separa los centros aceptores de protones.

En bacterias que nadan, los complejos de conductos se mueven con más frecuencia hacia la derecha que hacia la izquierda porque los centros del anillo que están en contacto con el semiconductor externo tienen una probabilidad mayor de estar protonados que los centros que están en contacto con el semiconductor interno. El origen de esta asimetría radica en el hecho de que, en condiciones fisiológicas, la concentración de protones en ambos centros es distinta porque el potencial químico de los protones en el exterior es mayor que en el interior. En general, los gradientes de protones son una fuente de energía libre rápidamente interconvertible. Ya vimos dos ejemplos de ello en un capítulo precedente. En células bacterianas, la lactosa permeasa acopla el transporte de lactosa en contra de gradiente con el flujo de protones a favor de gradiente. La bacteriorrodopsina aprovecha la energía luminica para generar un gradiente de protones. En el mecanismo del motor flagelar tiene lugar la transducción de un gradiente de protones en movimiento rotatorio.

Propiedades del músculo esquelético:

El músculo esquelético es conocido como estriado debido a que sus células parecen estar llenas de líneas transversales regulares o estrias. Cuando se observan con luz polarizada, las fibras de músculo estriado parecen tener bandas alternas que son óptimamente isotropas (bandas I) o anisótropas (bandas A). Las bandas I son más estrechas que las A y presentan en su centro una zona más densa denominada línea Z. La longitud que separa las líneas Z se conoce como sarcómero, la unidad de repetición fundamental de la estructura muscular. Las bandas A son divididas en dos por un área más clara denominada banda H, en cuyo centro se sitúa la línea M. Las estrias discurren perpendiculares a la longitud del músculo. Las marcas longitudinales son fibrillas individuales, cada una de las cuales queda rodeada por una fina membrana denominada sarcolema. Las fibrillas están constituidas por numerosas moléculas de actina, miosina y otras proteínas regulares afines.

Miosina:

Funciones:

La miosina tiene tres actividades biológicas importantes: En disoluciones de fuerza iónica y pH fisiológicos, las moléculas de miosina se ensamblan espontáneamente en filamentos. De hecho, el filamento grueso consta principalmente de moléculas de miosina. La miosina es un enzima. Vladimir Engelhardt y Militsa Lyubimova descubrieron en 1939 que la miosina es una ATPasa.



Esta reacción es la fuente inmediata de energía libre que posibilita la contracción muscular. La miosina se une a la forma polimerizada de la actina, el constituyente principal del filamento delgado. Ciertamente esta interacción es crítica para la generación de la fuerza que hace desplazar a los filamentos delgados y gruesos uno sobre otro.

Concepto:

La miosina es una molécula muy grande (540 kd). Contiene dos cadenas pesadas idénticas (de 230 kd cada una) y cuatro cadenas ligeras (de unos 20 kd cada una). Las micrografías electrónicas muestran que la miosina consta de una región globular en forma de doble cabeza, unida a una varilla extraordinariamente larga. La varilla está formada por un α -helicoides de dos hebras, a su vez enrolladas en α -helicoides, que corresponde a las cadenas pesadas. En cada cabeza hay dos cadenas ligeras distintas, unidas a la cadena pesada.

La miosina constituye alrededor de 60% de la proteína total del músculo esquelético.

La miosina posee actividad ATPasa. La miosina es el sitio de transducción de energía donde la energía química del ATP es convertida a energía mecánica.

Uniones transversales de los filamentos producen fuerza mecánica

La miosina, una proteína que une actina, fue la primera proteína de este tipo en ser descrita y caracterizada. Es la principal proteína de las miofibrillas del

músculo, pero también se encuentra en menores cantidades en muchos otros tipos celulares de los vertebrados. En todos los casos tiene el potencial para generar fuerza mecánica cuando interacciona con la actina F; sin embargo en las células no musculares la miosina polimeriza en menor grado que en el músculo, por lo que las fuerzas producidas son menores.

Actina

Concepto

La actina, una proteína universal de los eucariotas, es el constituyente principal de los filamentos delgados. En disoluciones de baja fuerza iónica, la actina es un monómero de 42 kd, llamado actina - G a causa de su forma globular. Los análisis cristalográficos con rayos X han demostrado que la actina consta de dos dominios globulares y tiene unas dimensiones aproximadas de 30 x 40 x 70. A medida que se aumenta la fuerza iónica hasta el nivel fisiológico, la actina-G se polimeriza en una forma fibrosa llamada actina-F, que se parece mucho a los filamentos delgados. Una fibra de actina - F aparece en las micrografías electrónicas como dos sargas de abalorios enrollados uno respecto al otro. Los patrones de difracción de rayos X muestran que la actina-F es una hélice de monómeros de actina. La hélice tiene un diámetro de unos 90 Å. La estructura se repite a intervalos de 360 Å a lo largo del eje de la hélice.

Interacción entre actina y miosina

Contracción muscular:

Cuando se añade una disolución de actina a una disolución de miosina, se forma un complejo llamado acto miosina. La formación de este complejo va acompañada por un gran aumento en la viscosidad de la disolución. En los años 40, Albert Szent - Gyorgyi demostró que este aumento en la viscosidad se invertía por adición de ATP. Esta observación reveló que el ATP disocia a la acto miosina en actina y miosina. Szent - Gyorgyi también preparó hebras de acto miosina en las cuales las moléculas se orientaban por el flujo. Se obtuvo un resultado sorprendente cuando las hebras se sumergieron en una disolución que contenía ATP, K^+ y Mg^{2+} . Las hebras de acromiosina se contrajeron, mientras que las hebras formadas solamente por miosina se contrajeron, mientras que las hebras formadas solamente por miosina no lo hicieron. Estos experimentos incisivos sugirieron que la fuerza de la contracción muscular se produce por la interacción de miosina, actina y ATP.

Los filamentos gruesos

La formación y disociación cíclica del complejo entre la miosina y la actina produce un movimiento coherente porque estas moléculas son componentes de ensamblajes altamente ordenados. La organización de las moléculas de miosina en el filamento grueso ha sido dilucidada por Hugh Huxley. Los filamentos gruesos disociados tienen un diámetro de 160 Å y una longitud de 1,5 µm (15 000 Å). de estos filamentos sobresalen puentes cruzados en una disposición helicoidal regular, a intervalos de 143 Å, a lo largo del eje del filamento;

recordemos que con estas misma periodicidad existían regularidades en la secuencia de los aminoácidos situados en la cola de la miosina. En la zona media del filamento grueso existe una región de 1 500 Å de longitud - región lisa o vacía - libre de puentes cruzados proyectantes.

Los mismos aspectos estructurales son evidentes en los filamentos gruesos sintéticos que se producen disminuyendo la fuerza iónica de una disolución de miosina. Los filamentos sintéticos más cortos son de unos 3 000 Å de longitud y contienen una región vacía de 1 500 Å situada en su parte central que corresponde aproximadamente a la longitud de la cola de miosina. Los filamentos gruesos crecen por adición de moléculas de forma paralela a las ya ensambladas. Las moléculas de miosina situadas a un lado de la zona vacía apuntan en una dirección, mientras que las del otro lado apuntan en la dirección opuesta. Así pues, un filamento grueso es intrínsecamente bipolar.

Los filamentos delgados también son direccionales, es decir, que están orientados. Si la miosina (o la HMM, o la SI) se añade a los filamentos delgados o a la actina - F, aparece en las micrografías electrónicas un patrón de cabezas de flecha. Estas estructuras se denominan, de forma gráfica, filamentos decorados. Las flechas en ambas hebras del filamento decorado siempre apuntan en la misma dirección en toda su longitud. Así pues, los filamentos delgados tienen también direccionalidad intrínseca.

La actina potencia actividad ATPasa de la miosina

Revisemos ahora la generación de la fuerza contráctil. Una primera clave muy reveladora fue el descubrimiento de que la actividad ATPasa de la miosina

se potenciaba extraordinariamente por acción de la F-actina. Por cierto, Albert Szent - Gyuorgyi llamó actina a esta proteína por su capacidad de activar la hidrólisis del ATP realizada por la miosina. La actina aumenta el número de recambio de la miosina en unas 200 veces, de $0,05 \text{ s}^{-1}$ a 10 s^{-1} . El ATP unido a la miosina se hidroliza con rapidez pero los fragmentos de ADP y P tardan en abandonarla. Edwin Taylor propuso un modelo en el que la actina aumentaba el número de recambio de la miosina porque se unía al complejo miosina -ADP-P y aceleraba la liberación de los productos de la hidrólisis. La acto miosina enlazaba entonces un nuevo ATP que facilitaba la disociación de la actina y la miosina. El complejo resultante ATP - miosina quedaba así dispuesto para otro ciclo de catálisis. Estas reacciones, como las de todas las ATPasas conocidas, requieren Mg^{2+} .

La interacción de las cabezas S1 de la miosina con la actina ha sido visualizada mediante microscopía electrónica de filamentos delgados de corados con S1. La imagen mostrada se obtuvo promediando los datos procedentes de muchas micrografías de filamentos sin teñir que habían sido congelados en delgadas películas acuosas a baja temperatura. La ventaja de esta técnica es que en ella se ve la estructura nativa, en vez de la distribución de la densidad electrónica de las tinciones. Los monómeros de actina de estos filamentos delgados decorados constan de dos dominios; la línea que los une es casi perpendicular al eje del filamento. La tropomiosina, que participa en el control de la contracción, corre longitudinalmente a lo largo del filamento. Las cabezas S1 están distribuidas en helicoide en la periferia de estos filamentos decorados. Cada S1 se une al dominio externo de una sola unidad de actina. El otro extremo de S1

está por lo menos a 130 Å del centro de unión de la actina. Estas uniones entre S1 y actina se hacen en ausencia de ATP. Esta geometría corresponde probablemente a la fase final del golpe de potencia que tiene lugar in vivo, justo antes de la unión del ATP.

La troponina y la tropomiosina intervienen en la regulación de la contracción muscular por el ION calcio

El regulador fisiológico de la contracción muscular es el Ca^{2+} . En el músculo esquelético en estado de reposo (relajado) el Ca^{2+} queda secuestrado en el retículo sarcoplásmico, una forma especializada de retículo endoplásmico, mediante un sistema de transporte activo. Este bombeo, dirigido por el ATP, hace disminuir la concentración de Ca^{2+} en el citosol por debajo de 1 μM . El impulso nervioso provoca la liberación del Ca^{2+} de los sacos del retículo sarcoplásmico, por lo que la concentración citosólica alcanza el valor de 10 μM y produce la contracción muscular. Setsuro Ebashi descubrió que el efecto del Ca^{2+} sobre la interacción de la actina y la miosina está mediado por la tropomiosina y el complejo de troponina, que están localizados en el filamento delgado y constituyen aproximadamente un tercio de su masa. La tropomiosina es un bastoncillo α -helicoidal de dos hebras. Esta proteína de 70 kd, de forma muy alargada, está orientada casi paralelamente al eje longitudinal del filamento delgado. La troponina es un complejo de tres cadenas polipeptídicas: TnC (de 18 kd), TnI (de 24 kd) y TnT (de 37 kd). La TnC se une a los iones calcio, la TnI se une a la actina y la TnT a la tropomiosina. El complejo de la troponina queda

localizado en los filamentos delgados a intervalos de 385 Å, periodo establecido por la longitud de la tropomiosina. Cada complejo de troponina regula la actividad de unos siete monómeros de actina.

La troponina C, el componente del complejo que es sensible al calcio, consta de dos dominios homólogos. Los dominios globulares amino - terminal y carboxilo terminal están conectados por una larga α -hélice de nueve vueltas. Cada dominio contiene dos centros del dominio aminoterminal presentan una afinidad baja ($K_d = 10 \mu\text{M}$). La TnC es un miembro de la familia de proteínas que se enlazan al calcio y tienen importantes funciones reguladoras. La estructura de la TnC es muy parecida a la de la calmodulina, una proteína omnipresente sensible al calcio.

En el músculo en reposo los centros de alta afinidad están ocupados por Ca^{2+} pero los de baja afinidad están vacíos. El Ca^{2+} ocupa los centros de baja afinidad cuando éste se libera del retículo sarcoplásmico, con lo que cambia la conformación del dominio amino - terminal y se vuelve semejante al dominio carboxilo - terminal. Este cambio conformacional en la TnC se transmite a los otros componentes del complejo de la troponina y después a la tropomiosina. Parece como si la TnT, que tiene una forma muy alargada, controlase la posición de la tropomiosina con respecto al filamento delgado, cerca de la interfase entre la actina y las cabezas S1 de la miosina. Un pequeño desplazamiento en la posición de la tropomiosina puede alterar notoriamente la unión de la actina a S1 o bien la capacidad de este complejo para sufrir cambios estructurales en el ciclo de la formación de puentes cruzados.

De hecho, los experimentos de difracción de rayos X, con mediciones de tiempo, han revelado que cuando el músculo esquelético se activa por acción de un impulso nervioso, la tropomiosina se desplaza antes de que lo hagan las cabezas S1. El tiempo medio del desplazamiento de la tropomiosina es de 17 ms, comparado con los 25 ms del desplazamiento de la miosina y los 45 ms necesarios para generar la tensión. Evidencias posteriores sobre la necesidad del acoplamiento troponina - tropomiosina para regular la contracción proceden de los ensayos de motilidad in vitro. El desplazamiento de esferas tapizadas de miosina sobre cables de actina es insensible al Ca^{2+} cuando están presentes sólo estas dos proteínas. La adición de troponina y tropomiosina hace que las esferas respondan al Ca^{2+} . Cuando falta el Ca^{2+} el desplazamiento queda bloqueado y puede restablecerse al añadir niveles micromolares de este ion. Así pues, un sistema reconstituido conteniendo solamente cuatro proteínas miosina, actina, troponina y tropomiosina manifiesta un movimiento regulado por el calcio. Resulta pues evidente que el Ca^{2+} controla la contracción muscular por un mecanismo alostérico en el que el flujo de información transcurre así:

$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{troponina} \rightarrow \text{tropomiosina} \rightarrow \text{actina} \rightarrow \text{miosina}$

Músculo liso

El músculo liso carece de las estriaciones microscópicas mostradas por el músculo esquelético y el cardíaco.

Esta diferencia entre el músculo liso y el estriado se debe a la falta de disposición regular de filamentos delgados y gruesos ordenados. El músculo liso posee actina

y miosina pero de manera menos ordenada que los componentes correspondientes del músculo estriado. La contracción del músculo liso, igual que la del músculo estriado, es regulada por alteraciones en la concentración de calcio intracelular. El músculo liso, a diferencia del músculo estriado esquelético y cardíaco, carece de un retículo sarcoplásmico bien definido. Las velocidades de cambio del calcio citoplásmico son mucho más lentas en el músculo liso que en el músculo estriado. Esto permite una respuesta estable, lenta, de la tensión contráctil. Además, el músculo liso carece del sistema de troponina y utiliza la fosforilación de proteína para iniciar y mantener la contracción.

Fuerza mecánica entre los filamentos gruesos y delgados

La fuerza mecánica se genera por una reacción cíclica entre las cabezas de miosina sobre los filamentos gruesos y la actina F o filamentos delgados. La energía para esta fuerza proviene de la hidrólisis del ATP, ya que la miosina por sí misma es una ATPasa. En presencia de actina la velocidad de la reacción aumenta unas 200 veces; la unión de actina acelera la liberación de los productos ADP y fosfato y origina un cambio conformacional alrededor de la cabeza de miosina. A esto se le denomina potencia del golpe. Por la unión del ATP la cabeza de miosina se libera del filamento de actina, y posteriormente se hidroliza el ATP. Con la unión de miosina -ADP a la actina, puede iniciarse un nuevo ciclo. Durante la contracción rápida cada ciclo puede tomar 0.2 s. este proceso se ilustra. Es de notar la importancia de las dos áreas de bisagra en la miosina, las cuales permiten la flexibilidad del movimiento. No se conocen con certeza los detalles de

los cambios conformacionales; en las miofibrillas hay cientos de cabezas de miosina en cada filamento grueso, y durante la contracción aproximadamente la mitad están unidas a la vez, de manera que siempre se mantiene la presión.

Los complejos de tropomiosina y troponina presentes en los filamentos efectúan a cabo funciones claves en el músculo estriado

En el músculo estriado hay otras cuatro proteínas que se consideran menores en términos de su contribución a la masa, pero importantes en términos de su función. La tropomiosina es una molécula fibrosa que consta de dos cadenas, alfa y beta, que se adhiere a la F - actina en el surco entre los dos polímeros. La tropomiosina está presente en todos los músculos y estructuras similares. El complejo de la troponina es exclusivo del músculo estriado y está constituido por tres proteínas separadas. La troponina T (TpT) se une a la tropomiosina así como a los otros dos componentes tropónicos. La troponina I (TpI) inhibe la interacción F-actina miosina y también se une a los otros dos componentes de troponina. La troponina C (TpC) es una proteína fijadora de calcio que tiene estructura primaria y secundaria así como una función bastante parecida a la de la calmodulina, proteína ampliamente esparcida en la naturaleza. Por cada molécula de troponina C o de calmodulina, se fijan cuatro moléculas de troponina C o de calmodulina, se fijan cuatro moléculas del ion calcio, y ambas moléculas proteínicas tienen una masa molecular de 17 kDa.

Músculo esquelético	Músculo cardiaco	Músculo liso
Estriado	Estriado	No estriado
No sincital	Sincital	Sincital
Túbulos T pequeños	Túbulos T grandes	En general, túbulos T rudimentarios
RS desarrollado y bomba de Ca^{2+} que actúa con rapidez	Hay SR y la bomba de Ca^{2+} actúa con cierta rapidez	A menudo, RSR rudimentario y bomba de Ca^{2+} lenta
El plasmalema carece de numerosos receptores para hormonas	El plasmalema contiene un surtido de receptores (por ejemplo, α y β adrenérgicos)	El plasmalema contiene un surtido de receptores (por ejemplo, α y β adrenérgicos)
El impulso nervioso inicia la contracción	Tiene ritmicidad intrínseca	La concentración es iniciada por impulsos nerviosos, hormonas, etcétera
El Ca^{2+} del LEC no es importante para la contracción	El Ca^{2+} del LEC es importante para la contracción	El Ca^{2+} del LEC es importante para la contracción
Posee sistema de troponina	Posee sistema de troponina	Carece del sistema de troponina; usa cabeza de miosina reguladora
No emplea la proteína caldesmona	No emplea la proteína caldesmona	La caldesmona es una proteína reguladora importante
Ciclo muy rápido de los puentes cruzados	Ciclo relativamente rápido de los puentes cruzados.	El ciclo lento de los puentes cruzados permite prolongar la contracción y utilizar menos ATP.

El Ca^{2+} regula también la contracción del músculo liso

Aunque los músculos contienen actina, miosina y tropomiosina, únicamente los músculos estriados de los vertebrados contienen el sistema de la troponina. De ahí que el mecanismo que regula la contracción debe diferir en varios sistemas de contracción.

Los músculos lisos tienen estructuras moleculares muy semejantes a los del músculo estriado pero los sarcómeros no están alineados de la manera en que están los de la apariencia estriada. Los músculos lisos contienen moléculas de alfa actina y tropomiosina, como el músculo esquelético. No tienen el sistema de troponina y las cadenas ligeras de las moléculas de miosina difieren de las de la miosina del músculo estriado. No obstante, al igual que en el músculo estriado, la contracción del músculo lisos es regulada por el Ca^{2+} .

La fosforilación de las cadenas P ligeras de miosina inicia la contracción del músculo liso

Cuando la miosina del músculo liso se une a la F - actina en ausencia de otras proteínas musculares como la tropomiosina, no se detecta actividad de la ATPasa. Esta ausencia de ATPasa hace bastante diferente la situación en relación a la descrita para la miosina y la F - actina del músculo estriado que tienen una abundante actividad de ATPasa. La miosina del músculo liso contiene una cadena ligera (cadena ligera p) que impide la fijación de la cabeza de miosina a la F-actina. La cadena ligera p debe ser fosforilada antes de permitir a la F-actina que active a la miosina ATPasa. La actividad que se obtiene de ATPasa hidroliza el ATP alrededor de 10 veces más lenta que la actividad correspondiente

en el músculo esquelético. El fosfato de la miosina de la cadena ligera puede quedarse con el Ca^{2+} fijado al complejo tropomiosina TpC - actina, lo cual incrementa la velocidad de la formación de puentes cruzados entre las cabezas de miosina y actina. La fosforilación de la cadena ligera p inicia el ciclo de la contracción de adherencia y separación del músculo liso.

	Músculo estriado	Músculo liso (y células no musculares)
Proteínas de los filamentos musculares	Actina Miosina Tropomiosina Troponina (TpL, TpT, TpC)	Actina Miosina Tropomiosina
Interacción espontánea de F - actina y de miosina sola (activación espontánea de miosina ATPasa por la F-actina)	Si	No
Contracción activada por	Ca^{2+}	Ca^{2+}
Efecto directo del Ca^{2+}	El grupo 4 Ca^{2+} se une a la TpC	El grupo Ca^{2+} se une a la calmodulina
Efecto del Ca^{2+} unido a proteína	El complejo TpC 4 Ca^{2+} antagoniza la inhibición de la Tpl sobre la interacción F-actina - miosina (permite la activación de la ATPasa por la F-actina)	El complejo calmodulina 4 Ca^{2+} activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina que fosforila a dicha cadena. LA cadena ligera p fosforilada ya no inhibe la interacción F-actina - miosina (permite la activación de la ATPasa por la F-actina).

La regulación basada en la actina tiene lugar en el músculo estriado

Esta regulación se presenta en los músculos esqueléticos y cardíaco de los vertebrados ambos estriados. En el mecanismo general antes descrito, el único factor potencialmente limitante en el ciclo de la contracción muscular podría ser el ATP. El sistema muscular esquelético está inhibido en reposo y es desinhibido para la contracción activa. El inhibidor del músculo estriado es el sistema de la troponina, el cual se une a la tropomiosina y a la F-actina en el filamento delgado. En el músculo estriado, no hay control de la contracción, a menos que los sistemas tropomiosina - troponina estén presentes junto con los filamentos de actina y miosina. Como se indicó, la tropomiosina yace a lo largo del surco de la F-actina y los tres componentes de la troponina -TpT, Tpl y TpC están unidos al complejo F - actina tropomiosina. La Tpl impide la fijación de la cabeza de miosina a su sitio de adherencia en la F-actina ya sea por alterar la conformación de ésta con ayuda de las moléculas de tropomiosina, o simplemente por enrollamiento de la tropomiosina en una posición que bloquea directamente los sitios en la F-actina a los cuales se adhieren las cabezas de miosina. Cualquiera de las formas impide la aceleración de la ATPasa de la miosina que es mediada por la fijación de la cabeza de miosina a la F-actina. Por tanto, el sistema Tpl bloquea el ciclo de la contracción en el paso. Esto da razón del estado inhibido del músculo estriado relajado.

El retículo sarcoplásmico regula las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en el músculo esquelético

En el sarcoplasma del músculo en reposo, la concentración de Ca^{2+} es de 10^{-8} mol/L. el estado de reposo se alcanza debido a que el Ca^{2+} se bombea hacia el retículo sarcoplásmico a través de la acción de un sistema de transporte activo denominado Ca^{2+} ATPasa lo que inicia la relajación. El retículo sarcoplásmico es una red de sacos de membrana fina; en su interior, el Ca^{2+} se fija a una proteína específica fijadora de Ca^{2+} llamada calsecuestrina. El sarcómero está rodeado por una membrana excitable (el sistema del túbulo T) compuesto de conductos transversos (T) estrechamente relacionados con el retículo sarcoplásmico.

Cuando el sarcolema se excita por un impulso nervioso, la señal se transmite hacia el sistema del túbulo T y el conducto liberador de Ca^{2+} , localizado cerca del retículo sarcoplásmico dentro del sarcoplasma. La concentración de Ca^{2+} en éste se eleva pronto a 10^{-5} mol/L. los sitios de fijación de Ca^{2+} en la TpC del filamento delgado son rápidamente ocupados por este ion. El complejo TpC 4 Ca^{2+} interactúa con la Tpl y la TpT para alterar su relación con la tropomiosina. En consecuencia, la tropomiosina simplemente se retira de su lugar o modifica la conformación de la F-actina permitiendo que el ADP y P de las cabezas de miosina interactúen con la F-actina para iniciar el ciclo de la contracción.

El conducto liberador del Ca^{2+} se conoce también como el receptor de rianodina (RYR). Hay dos isoformas de este receptor, RYR1 y RYR2; el primero está presente en el músculo esquelético y el segundo, en el músculo cardíaco y encefálico. La rianodina es un alcaloide vegetal que se une a RYR1 y RYR2 de manera específica y modula sus actividades. El conducto liberador del Ca^{2+} es un homotetrámero constituido por cuatro subunidades de 565 kDa. Tiene secuencias

transmembrana en su terminal carboxilo y es probable que éstas formen el conducto para Ca^{2+} . El resto de la proteína se proyecta en el citosol, formando un puente que salva el espacio entre el retículo sarcoplásmico y la membrana tubular transversa. El paso del conducto es accionado por Ca^{2+} y ATP que actúan de modo sinérgico, in vitro, aunque la manera en que operan in vivo no está clara.

La relajación tiene lugar cuando:

1. El Ca^{2+} del sarcoplasma baja a menos de 10^{-7} mol/L debido a su secuestro en el retículo sarcoplásmico por la Ca^{2+} ATPasa.
2. La TpC 4 Ca^{2+} pierde su Ca^{2+} .
3. La troponina, por medio de su interacción con la tropomiosina inhibe ulteriormente la relación entre la cabeza de miosina y la F-actina.
4. En presencia de ATP, la cabeza de miosina se desprende de la F-actina para inducir la relajación. Así, el Ca^{2+} controla la contracción muscular por un mecanismo alostérico mediado en el músculo por TpC, Tpl, TpT, tropomiosina y F-actina.

El decremento en la concentración de ATP en el sarcoplasma (por ejemplo, por el uso excesivo durante el ciclo de contracción - relajación o por síntesis escasa, como podría ocurrir en la isquemia) tiene dos efectos principales:

1. La Ca^{2+} ATPasa (bomba de calcio) e el retículo sarcoplásmico cesa de conservar la concentración baja sarcoplásmica de Ca^{2+} . Por tanto se promueve la interacción de las cabezas de miosina con la F-actina.
2. La separación dependiente de ATP de las cabezas de miosina de la F-actina, no puede tener lugar y se presenta la rigidez (contracción). El rigor mortis, que sigue a la muerte, es una extensión de estos procesos.

La contracción muscular es un equilibrio dinámico delicado de adhesión y separación de las cabezas de miosina a la F-actina. El sistema está sujeto a una regulación fina por medio del sistema nervioso.

Componente	Peso molecular	Estructura	Función
Miosina	540	Dos cadenas pesadas	ATPasa
		Dos cadenas ligeras esenciales	Filamento grueso
Actina	42	Dos cadenas ligeras reguladoras	Interactúa con la miosina para generar fuerza
		La actina monomérica globular forma actina filamentosa	Filamento delgado
Tropomiosina	70	Catorce monómeros por vuelta de la hélice	Bloquea la unión de actina a miosina
Troponina	76	Dos subunidades enrolladas se extienden a lo largo de siete monómeros de actina	Controla la inhibición por la tropomiosina
		Troponina I, 21 kDa	Se enlaza a la tropomiosina y a la troponina C
		Troponina T, 37 kDa	Se enlaza a Ca^{2+}
		Troponina C, 18 kDa	

Información de internet

Músculo

Los músculos se clasifican en dos grupos, los estriados y lisos. Los estriados son los más estudiados y se les llama así porque bajo el microscopio de luz aparece como miofilamentos paralelos regulares, organizados en sarcómeros bandeados. En los músculos lisos las células son elongadas y fusiformes con un solo núcleo, sus miofibrillas por lo general están alineadas longitudinalmente y al contraerse acortan y engruesan la célula. El músculo estriado es de origen sincicial; cada fibra se forma por repetidas divisiones celulares, hasta que finalmente desaparecen las membranas celulares de las células hijas, por lo que las células son multinucleadas.

El músculo liso se presenta en todos los animales con musculatura, formando capas longitudinales o circulares en la pared corporal o el tubo digestivo o paredes vasculares. El músculo estriado forma la musculatura esquelética, sea en la superficie interna del exoesqueleto o en la superficie externa del endoesqueleto.

En vertebrados solo los músculos estriados están bajo control voluntario.

Un músculo contiene muchas miofibrillas paralelas, cada una dividida en una serie de sarcómeros, el elemento contráctil base. Las sarcómeros contiene filamentos delgados y gruesos. Los filamentos delgados contienen actina están unidos al extremo del sarcómero (consiste en unidades cilíndricas repetidas, cada una es la unidad contráctil) y se extienden hacia el centro donde se interdigitan con los filamentos gruesos que son de miosina, en respuesta a un incremento en Ca^{2+} dentro de la fibra muscular los filamentos delgados se deslizan sobre los gruesos acortando el sarcómero.

En reposo la miosina no puede unirse a la actina porque la tropomiosina le estorba, cuando la fibra muscular se despolariza y los potencialisa de acción se propagan producen que se abran canales de calcio y se libere Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y se une con la troponina, una proteína que encuentra unida tanto a la actina como a la tropomiosina, al unirse el Ca^{2+} la troponina y la tropomiosina sufren un cambio conformacional y se liberan los sitios de unión a la miosina de la actina. Cuando la membrana se repolariza el retículo sarcoplásmico recaptura Ca^{2+} removiéndolo de la troponina causando que el músculo se relaje (mientras

haya ATP). El músculo liso también requiere de Ca^{2+} pero el mecanismo es diferente al del músculo estriado.

El largo de un músculo determina la fuerza de la contracción debido al grado de solapamiento entre los filamentos delgados y los gruesos, y la tensión ejercida por sus componentes elásticos. Dentro del intervalo normal de trabajo de un músculo la relación entre la fuerza y la longitud no es lineal y el control neural debe compensar esto para asegurarse que la fuerza de la contracción es apropiada para cualquier carga dada. La contracción muscular puede ser isométrica, cuando el largo permanece constante y la fuerza se incrementa hasta que iguala la de la carga que debe soportarse, o isotónica, cuando ejerce una fuerza constante para que el músculo se acorte hasta mover la carga.

La placa neuromuscular es la sinapsis entre una neurona motora y una fibra muscular. La acetilcolina (ACH) liberada por la terminal nerviosa activa receptores nicotínicos colinérgicos en la membrana muscular que hace que se despolarice. La secreción de ACH de una sola vesícula produce un potencial miniatura de la placa terminal de 0.4 mV. La liberación de ACH de varias vesículas en respuesta a la llegada de un potencial de acción en la terminal provoca la suma de muchos potenciales miniatura que dan un potencial de placa terminal, una despolarización suficientemente grande para disparar potenciales de acción de las fibras musculares.

Los potenciales de acción se propagan en invaginaciones de la membrana de la fibra muscular. Esta despolarización causa que se libere Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El incremento intracelular de este ión dispara la contracción

Conclusión

El músculo estriado de los vertebrados consta de dos clases de filamentos proteicos que interaccionan entre sí. Los filamentos gruesos contienen miosina, mientras que los filamentos delgados contienen actina, tropomiosina y troponina. La hidrólisis del ATP unido a la miosina dirige el deslizamiento de estos filamentos unos sobre otros. La miosina es una proteína muy gran (52° kd) compuesta de dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. Las cadenas pesadas están plegadas de manera que forman dos cabezas S1 alargadas unidas a una varilla α -helicoidal de dobles hebras enrolladas. Dos cadenas ligeras se unen a cada cabeza S1 y su función es reguladora. Las cabezas S1 y parte de la varilla forman puentes cruzados que interaccionan con la actina para generar la fuerza contráctil. El resto de la molécula de miosina forma el esqueleto del filamento grueso. La actina es una proteína globular (42 kd) que se polimeriza para formar los filamentos delgados. Los filamentos delgados y gruesos tienen dirección, que se invierte a la mitad de camino entre las líneas Z.

La unión e hidrólisis del ATP dirige la formación y disociación cíclica de complejos entre los puentes cruzados de miosina de los filamentos gruesos y las unidades de actina de los filamentos delgados, acortando con ello la distancia entre las líneas Z. El golpe de potencia de la contracción muscular procede de cambios conformacionales que tienen lugar en las cabezas S1, que van acompañados de la disociación del ADP del centro de unión a nucleótidos. Las bisagras entre los diferentes dominios de la miosina son importantes porque permiten a las cabezas S1 unirse y liberarse reversiblemente de la actina y cambiar su orientación cuando están unidas. El movimiento dirigido por el ATP puede reconstruirse en sistemas sencillos y bien definidos. Esferas recubiertas de miosina se mueven unidireccionalmente sobre cables de actina. Experimentos de trampa óptica muestran que la distancia que recorre una única molécula de miosina en cada paso es de unos 11 nm. La contracción del músculo esquelético está regulada por el Ca^{2+} . La interacción de la actina y la miosina está inhibida por el complejo de la troponina y la tropomiosina cuando el nivel de Ca^{2+} es bajo. El impulso nervioso provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. La unión del Ca^{2+} a la troponina C, un miembro de una familia de proteínas sensibles al Ca^{2+} , llamada mano EF, altera la interacción de la tropomiosina con la actina, permitiendo a la miosina enlazar con la actina y generar la fuerza contráctil.

La actina y la miosina son proteínas antiguas, como lo demuestra su presencia en levaduras y mohos del limo. De hecho, estas proteínas ejercen funciones contráctiles en prácticamente todas las células eucarióticas. La actina, que es particularmente abundante, forma microfilamentos de 7 nm de diámetro. Los microfilamentos participan en una amplia gama de movimientos celulares, entre los que se cuentan la migración de las células durante el desarrollo, y el desplazamiento de los macrófagos hacia los tejidos dañados. Moléculas de miosina J con una sola cabeza transportan orgánulos rodeados de membrana a lo largo de filamentos de actina. En células no musculares, las diversas colas de las moléculas de miosina II, que costa de dos cabezas, especifican la mercancía que va a ser transportada mediante estos motores. Los citoesqueletos dinámicos de las células eucarióticas contienen también filamentos intermedios (~ 10 nm de diámetro) y microtúbulos (~ 30 nm de diámetro). Los filamentos intermedios están formados por proteínas que tienen en común una región central con α -helices superenrolladas pero el resto es variado. Los microtúbulos desempeñan múltiples funciones estructurales y contráctiles en prácticamente todas las células eucarióticas. Estas fibras huecas están formadas por subunidades globulares de α y β -tubulina. La colchicina inhibe los movimientos mediados por los microtúbulos, al bloquear su polimerización. Cada cilio o flagelo de eucariota contiene nueve microtúbulos dobles alrededor de otros dos sencillos. Los dobletes externos están unidos transversalmente por la dineína, que es una ATPasa. El deslizamiento, inducido por la dineína, de un doblete respecto al contiguo produce una curvatura del cilio y origina sus oscilaciones. Los microtúbulos sirven también como guía o rail para el movimiento de las vesículas y orgánulos. El rápido ensamblaje y disociación de los microtúbulos, dirigido por el GTP, es fundamental para su actividad durante el desarrollo celular; un ejemplo de ello es la formación del huso mitótico. Los microtúbulos se disocian de forma espontánea si no llegan a algún punto que establece sus extremos.

ERIKA GERALDINE ZARATE TINOCO

erikag19@terraimail.com.pe

Publicación enviada por ERIKA GERALDINE ZARATE TINOCO
Contactar mailto:erikag19@terraimail.com.pe