
Determinación Del Ancho Sarcomérico De Fibras Musculares A Través De Un Método De Difracción Láser

Felipe Zapata, Dairo Alonso Rendón, Pedro Torres

Escuela de Física. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

A.A.3840, Medellín, COLOMBIA.

RESUMEN

Una de las funciones principales del tejido muscular y cardíaco es su función contráctil. Las propiedades mecánicas de esta función contráctil se pueden estudiar por métodos ópticos ya que el tejido muscular y cardíaco se caracteriza por estar constituido interiormente por unidades básicas repetitivas (sarcómeros). Los sarcómeros poseen periodicidad espacial, lo que permite que sean considerados como una rejilla de difracción y por tanto basta analizar el patrón de difracción para deducir la distancia entre sus elementos constitutivos (ancho sarcomérico); la variación de este ancho sarcomérico con respecto a estímulos externos *in vitro* (concentración de calcio, impulsos eléctricos, etc.) constituye una de las propiedades mecánicas de las fibras cardíacas o musculares. En el presente trabajo se describe el montaje óptico experimental, las características de las fibras musculares aisladas, al igual que los resultados experimentales obtenidos. En muchas patologías del tejido cardíaco y muscular se ve involucrada su función contráctil, por tal razón la mencionada técnica tiene una gran importancia en investigaciones biomédicas relacionadas con los estados fisio-patológicos del corazón y de los músculos.

Palabras clave: Análisis celular, Propagación de la luz en tejidos, Fisiología, Instrumentación Óptica para Medicina, rejillas de difracción.

ABSTRACT

One of many functions of muscular and cardiac tissue is contraction. The mechanical properties of this function may be studied indirectly through optical methods, given that the muscular tissue has an internal structure composed by basic repeating motor units called sarcomeres. It is known that sarcomeres have a fringed structure and spatial periodicity, therefore they can be considered as a diffraction grating; the analysis of their diffraction pattern can be used to deduce the distance between those constitutive motor elements, or sarcomere length. Variations on this parameter with external stimuli *in vitro* (i.e. free Calcium concentration, electrical impulses, etc.) may be a representative measure of mechanical behaviour of fibres. In this work, an optical experimental setup is described, as well as the characteristics of isolated (skinned) fibres and experimental results. Many cardiac and muscular pathologies are influenced by contractile dysfunction, thus the implementation of this technique is very important for biomedical research in physiopathological states of any muscle type.

Keywords: (OCIS) Cell analysis, Light Propagation in Tissues, Physiology, Medical Optics Instrumentation, Diffraction gratings.

1. INTRODUCCIÓN

La causa de algunas de las afecciones musculares, en especial las patologías cardíacas, está estrechamente relacionada con anomalías en el funcionamiento de los elementos encargados de la contracción. Esta contracción muscular está gobernada por una gran cantidad de proteínas y reacciones que están completamente interrelacionadas e interconectadas, y cuyo buen funcionamiento se ve comprometido por muchos factores como genéticos, la acción de drogas y toxinas, entre muchos otros, los cuales afectan la generación de fuerza en cada fibra muscular.

Las células musculares, o miocitos, ver Figura 1A, tienen varios núcleos celulares y contiene muchas miofibrillas (Figuras 1B y 2A)^{1,2}; también poseen mitocondrias y otras organelas en menor proporción; además, las miofibrillas están rodeadas por una membrana llamada retículo sarcoplásmico. Cada miofibrilla posee al interior filamentos gruesos y delgados, solapados que están interconectados, pero subdivididos, longitudinal y transversalmente en sarcómeros (Figuras 2B y 2C). La contracción es activada por un potencial de impulso entregado a través de neurotransmisores que estimulan el flujo de iones, en especial iones de calcio que están contenidos en un almacenamiento natural llamado

retículo sarcoplásmico. Dicho calcio alcanza un sitio activo de la del complejo de troponinas, en especial la tipo C; luego, se generan cambios conformacionales en las actinas y acciones de ATPasa de las miosinas las cuales ‘caminan’ sobre los filamentos delgados (Figura 2C).

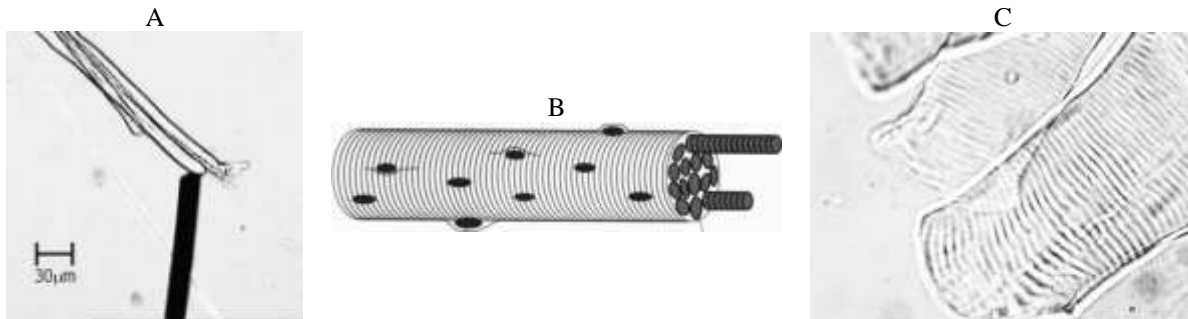


Figura 1. A. Micrografía óptica de transmisión de un ramillete de 3 miocitos de una fibra muscular esquelética, comparadas con un cabello humano, B. Detalle de la estructura de miofibrillas al interior de un miocito (diámetro externo ~20μm), dibujadas saliendo a la derecha (5), C. Micrografía óptica de transmisión de dos miocitos de una fibra muscular esquelética de rata (diámetro ~20μm cada uno), exhibiendo un patrón asociado a las “franjas” sarcoméricas.

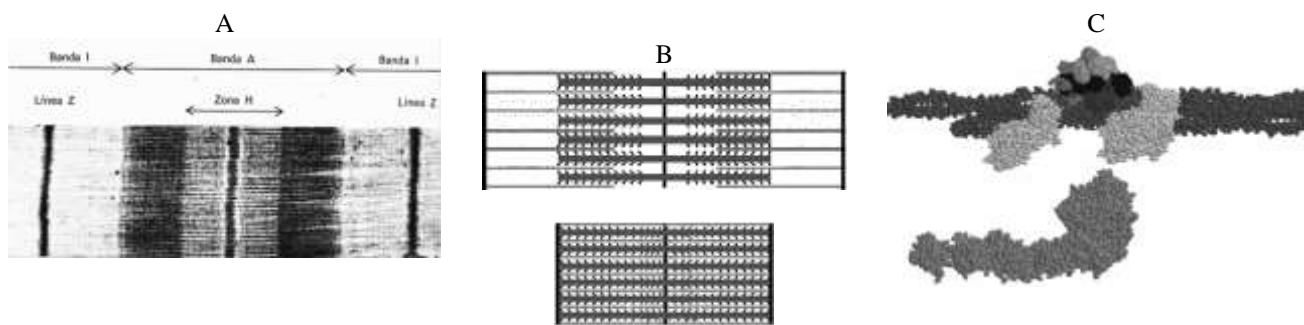


Figura 2. A. Micrografía de una miofibrilla donde se observa la estructura del sarcómero exhibiendo los puentes cruzados en la banda A, por fuera de la zona Z (2), B. Detalle de la configuración de las proteínas motoras donde se hacen evidentes los puentes cruzados, en situación relajada arriba, y de contracción abajo, C. Representación espacial de una unidad motora molecular obtenida con datos del PDB con RasMol; de abajo hacia arriba, cabeza y brazo de miosina, dos unidades de actina sobre una hélice de tropomiosina y por último el complejo de troponinas (6), estas integran la serie de motores moleculares asociados a los puentes cruzados; el filamento grueso es una cadena de miosinas y la hélice de tropomiosina da soporte al filamento delgado.

La regularidad espacial de las proteínas motoras de las fibras musculares y su comportamiento dinámico mutuo, permite asumir que esta estructura se puede hacer interactuar con algún tipo de radiación lumínica coherente, llámese luz visible, infrarroja o rayos-x, tal que dicha interacción pueda ser observada en un patrón de difracción (o de interferencia), cuyas propiedades morfológicas y de irradiancia están relacionadas funcionalmente con la geometría de las estructuras musculares. Por las características dimensionales del sistema motor microscópico, la radiación lumínica en el espectro visible resulta ser lo suficientemente buena para poder hacer algún tipo de medición del comportamiento sarcomérico a través de la difracción; sin embargo, se conoce que la técnica en la que se usa radiación de rayos-x de alta coherencia proveniente de un sincrotrón^{3,4} ofrece una característica de medida adicional pues al mismo tiempo que puede evaluar la situación de la distancia entre los sarcómeros, puede dar cuenta de la separación de las fibras que los contiene; es decir, es capaz de generar un patrón de difracción doble en direcciones perpendiculares entre sí, ya que la longitud de onda permite detectar la situación geométrica de las miofibrillas a través de la difracción. Por accesibilidad y costo, trabajar con fuentes de rayos-x coherentes y de alta energía no está al alcance, entonces, el trabajar con un láser resulta ser la alternativa más apropiada y, entre los diferentes tipos de láser, el de Helio-Neón resulta ser el más accesible y adaptable para dicho tipo de experimentación.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO DE ÓPTICA DIFRACTIVA PARA REJILLAS

De la geometría de la Figura 3, el campo electromagnético radiado desde el punto P , y que se examina en un punto del plano de abertura a una distancia R se puede escribir como:

$$\tilde{E} = \frac{A}{R} e^{i\phi} \quad \therefore \phi = \omega t - kR \quad (1)$$

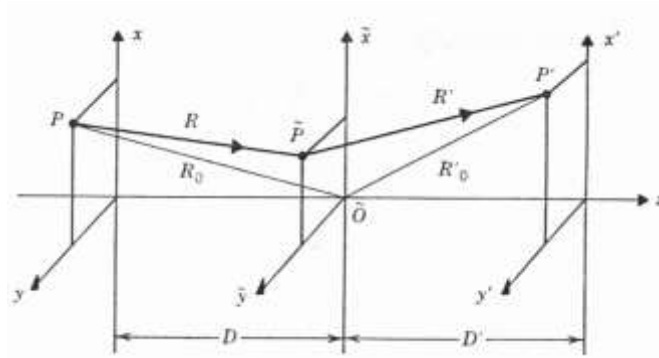


Figura 3. Geometría asociada al análisis de difracción⁷.

De aquí es claro que la interacción de dos fuentes secundarias en el plano abertura, originadas desde el punto P , y cuya energía radiada es proporcional tanto al tamaño de la abertura, $\Delta\tilde{\sigma}$, como al campo examinado en el plano de abertura (\tilde{E}_i), tiene la forma.

$$E' = C \left[\tilde{E}_1 \frac{e^{-ikR'_1}}{R'_1} + \tilde{E}_2 \frac{e^{-ikR'_2}}{R'_2} \right] \Delta\tilde{\sigma} \quad (2)$$

Entonces, para múltiples aberturas pequeñas se tiene que

$$E' = C \sum_{n=1}^N \tilde{E}_n \frac{e^{-ikR'_n}}{R'_n} \Delta\tilde{\sigma}_n \quad (3)$$

En el límite en el que el número N de aberturas tiende a infinito y el tamaño de las aberturas tiende a cero, la expresión (3) se convierte en la integral de Fresnel-Kirchhoff, cuya versión reducida es

$$E' = C \iint_{\tilde{\sigma}_0} \tilde{E}_n \frac{e^{-ikR'}}{R'} d\tilde{\sigma} \quad (4)$$

La solución analítica de esta integral por lo general es complicada; sin embargo, existe un caso particular en el que se puede hacer una aproximación que permite hallar una solución. La aproximación consiste en hacer que el camino óptico entre un punto que se encuentra en la apertura y el punto de observación, dependa linealmente de las coordenadas del plano de apertura, lo que puede ser logrado separando considerablemente el plano de observación del plano de apertura. Esta condición de campo lejano, más conocida como difracción de Fraunhofer, se puede expresar convenientemente mediante unas coordenadas modificadas (u, v) referentes al plano de observación⁷ como:

$$E'(u, v) = \frac{CAe^{i\phi_0}}{R_0 R_0'} \iint \tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y}) e^{-i2\pi(u\tilde{x} + v\tilde{y})} d\tilde{x}d\tilde{y} \quad (5)$$

Como se puede observar, con los límites de integración en el infinito, la ecuación (5) corresponde a la transformada de Fourier de la función $\tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y})$ que describe la geometría de la abertura. Como el caso de interés en este trabajo consiste en un conjunto finito contable de aberturas, por las propiedades de la transformada de Fourier, el análisis se reduce a la convolución entre la función de transferencia y una suma finita de funciones delta. En particular se analizan funciones periódicas $f(x)$

$$\begin{aligned} g &= f(x) \square \sum_m \delta(x - x_m) & f(x) &= \sum_{n=1}^N f(x - x_n) \\ G &= F(u) \sum_m e^{-i2\pi u x_m} & x_n &= (n-1)a \end{aligned} \quad (6)$$

en donde a es el espaciado entre los elementos periódicos de la función de transferencia. Luego, la transformada de Fourier queda de la siguiente forma

$$T(u) = T_1(u) \sum_{n=1}^N e^{-i2\pi u(n-1)a} \quad (7)$$

que al resolver se llega a que

$$T(u) = T_1(u) \left[\frac{\sin\left(\frac{N\delta}{2}\right)}{\sin\left(\frac{\delta}{2}\right)} \right] \quad \therefore \delta = -2\pi u a \quad (8)$$

Por lo tanto, con este último resultado, la irradiancia en el plano de observación es de la forma

$$S'(u, v) = M \frac{|T_1(u)|^2}{|T_1(0)|^2} \left[\frac{\sin\left(\frac{N\delta}{2}\right)}{\sin\left(\frac{\delta}{2}\right)} \right]^2 \quad (9)$$

donde $T_1(u)$ denota la transformada de Fourier de una sola abertura y M es una constante que incluye elementos dimensionales.

3. MÉTODOS

3.1. Obtención de fibras musculares

Se extrajeron fibras musculares del músculo Soleo y Gastronemio de ratas Sprague/Dawley que tuvieron agua y comida *ad limitum* con ciclos de luz normales. Simultáneamente se extrajeron trozos de las células papilares del ventrículo izquierdo de los corazones, para lo cual se realizó un corte horizontal aproximadamente a la altura del tejido valvular y luego se cortó el ventrículo derecho y el tabique intervertricular, para poder exponer el ventrículo izquierdo del cual se halan las fibras de la pared del miocardio y se separa de los tendones internos, obteniendo unos pequeños trozos alargados de aproximadamente 5 mm de largo, 3 mm de ancho y 1 mm de espesor.

Para mantener los tejidos vivos, estos se conservan en una solución de Krebs similar a la utilizada por Ventura-Clapier y otros⁸ (mM) NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 20, KH₂PO₄ 1.1, dextrosa 4.5 y CaCl₂ 1.8, a una temperatura de 4°C. En el caso particular de los corazones, se hizo una reperfusión de las cavidades internas con una jeringa ‘de insulina’ (1cc) a la que se le quitó el accesorio de la aguja y se reemplazó con la punta de una micro-pipeta.

Tras la extracción mecánica de algunos pedazos de tejido, estas muestras fueron llevadas a la solución de relajación similar a la de Ventura-Clapier⁸ (mM) NaCl 131, HEPES 15, Na₂ATP 5.97, MgCl₂ 6.31, EGTA 5, mas 1% (v/v) de Tritón X-100 (detergente no-iónico) para permeabilizar la membrana sarcoplásmica, sin destruir las miofibrillas o los miocitos. El proceso de digestión con el Tritón se llevó a cabo durante una hora a 4°C, al final del cual se siguió desgarrando mecánicamente el tejido para obtener las fibras y luego depositarlas en la solución de relajación sin Tritón, en la cual las fibras se pueden conservar a 4°C hasta 48 horas.

3.2. Montaje experimental para la obtención del patrón de difracción

El elemento esencial del montaje es una cámara de prueba constituida por un plato Petri estándar de vidrio, donde se mantenía funcional el tejido a través de las soluciones fisiológicas de manera que fuera posible iluminarla con la luz láser mientras se cambian los parámetros iónicos.

Con el espejo de la cabeza lectora de una unidad de CD se logró desviar el haz de un láser de Helio-Neón (632.8 nm) sobre el plato de Petri como se muestra en la Figura 4, aprovechando la lente que trae dicha cabeza para focalizarlo; no obstante, se hicieron ensayos sin la lente para examinar el comportamiento cuando se iluminaban muchos mas elementos de la fibra muscular. La haz difractado fue proyectada en un pantalla opaca de papel fino y recogida por una lente convergente para, posteriormente, enviar a una cámara CCD. La serie de imágenes adquiridas fueron capturadas con una tarjeta Matrox Meteor Framegrabber para realizar las medidas de distancia entre órdenes de difracción en píxeles (previa calibración).

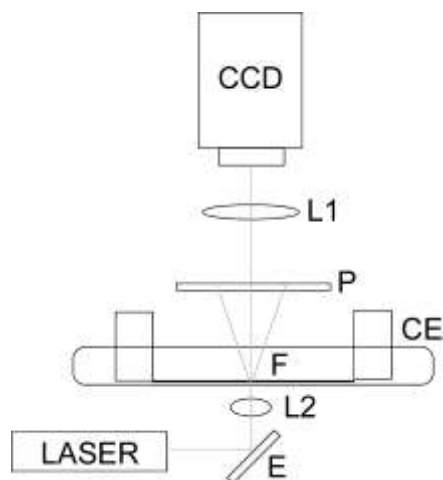


Figura 4. Montaje Experimental. L1: Lente de enfoque para la CCD, P: Pantalla de observación, CE: Cámara de estudio (plato de Petri con sujetadores de vidrio, F: Fibra muscular, E-L2: Espejo y lente de la cabeza lectora de CD para el desvío y enfoque del haz del láser.

En el plato Petri se mantenía una solución fisiológica de relajación, con una concentración baja de calcio, previamente preparada y con parámetros fisicoquímicos (concentraciones de iones libres y moléculas ligadas, en

particular Calcio libre) calculados con el programa BAD según Brooks y Storey⁹. Las fibras musculares fueron sujetadas con unas pinzas de papel aluminio en forma de H (también se ensayaron en forma de T) de aproximadamente 3 mm de ancho, ver Figura 5, y posteriormente fueron fijadas con un par de piezas de vidrio, para realizar lo que se denomina experimentos de contracción isométrica en donde la fibra desarrolla fuerza sin cambiar su longitud.

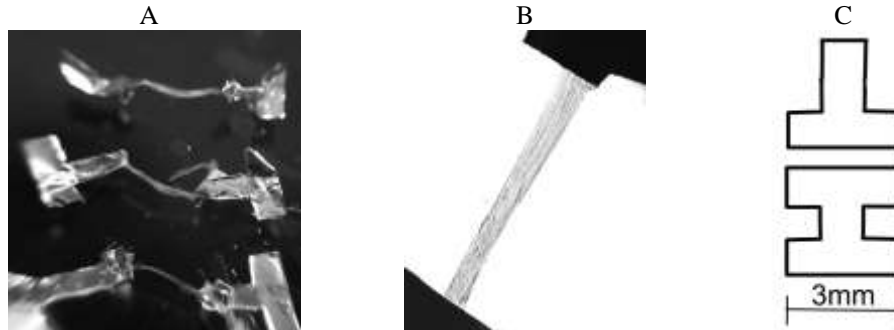


Figura 5. A. Fibras sujetadas con pinzas de papel aluminio, B. Micrografía de las mismas fibras estiradas, C. Forma de las pinzas.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se realizaron 5 pruebas de contracción isométrica, inyectando pequeños volúmenes de una dilución de cloruro de calcio (concentración no definida), con lo cual se generó una contracción reversible de las fibras musculares. Se capturaron 10 patrones, 5 en relajación y 5 en contracción, y se registraron los datos. En todos los casos, las fibras musculares se estiraron alrededor de un 30% de su longitud natural, algo que se debe tener en cuenta para el uso de la técnica. Se debe tener mucho cuidado en no alcanzar una contracción extrema irreversible (situación de tétano), pues el sistema empieza a generar un patrón de speckle que enmascara el patrón de difracción. Lo que se observaba se asemeja a lo que se ve en la Figura 6. Con las cinco muestra realizadas, el promedio estadístico indica que el ancho sarcomérico de las fibras analizadas es de $2.1 \mu\text{m}$, que concuerda muy bien con resultados reportados en la literatura¹⁰.

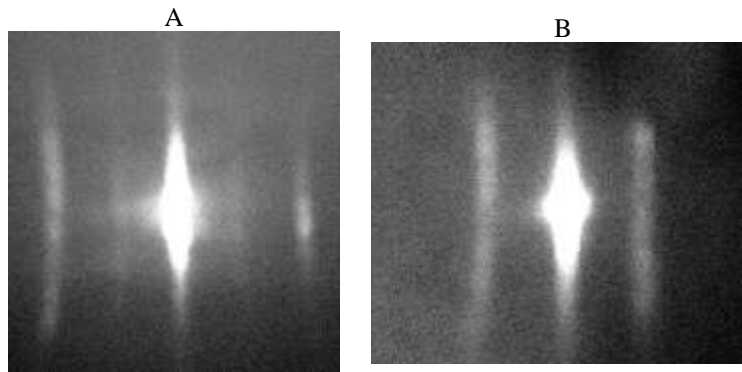


Figura 6. Patrones de difracción obtenidos en diferentes situaciones de contracción: A. Ancho sarcomérico: $\sim 2.1 \mu\text{m}$, distancia entre órdenes +2 y -2: $\sim 22 \text{ mm}$ y B. Ancho sarcomérico: $\sim 2.5 \mu\text{m}$, distancia entre órdenes +2 y -2: $\sim 16 \text{ mm}$.

Es importante señalar que en algunos casos se detectó que en ciertas situaciones de contracción, los máximos de difracción de tercer orden eran más intenso que los de segundo orden, lo que era un resultado inesperado. No obstante, resultados de simulación basados en la ecuación (9), no incluidos en este trabajo, muestran que esta situación particular se acomodaba a algunos comportamientos en la fibra muscular.

5. CONCLUSIÓN

La conclusión de este trabajo es que la función contráctil de tejidos musculares y cardiacos se puede estudiar a través del análisis del patrón de difracción que estos proyectan cuando interactúan con un haz de luz láser. Los sarcómeros poseen periodicidad espacial, lo que permite que sean considerados como una rejilla de difracción y por tanto basta analizar el patrón de difracción para deducir la distancia entre sus elementos constitutivos, llamado ancho sarcomérico. El montaje experimental desarrollado se llevó a cabo con elementos de fácil adquisición. Como característica especial, presenta la adaptación de los elementos ópticos básicos de una unidad lectora de CD, que facilitan iluminar con luz láser las fibras musculares en el plato de Petri donde se mantienen funcionales mientras se cambian los parámetros iónicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Ken Storey de la Universidad de Carleton, Canadá, por facilitar el código fuente del programa BAD.

REFERENCIAS

1. L.S. Constanzo. *Fisiología*. Primera Edición. McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 1, 2000.
2. L. Stryer. *Bioquímica*. Tercera edición (tomo II). Editorial Reverté. Capítulo 36, 1990.
3. M.A. Bagni, G. Cecchi, P.J. Griffiths, Y. Maeda, G. Rapp and C.C. Ashley. *Lattice spacing changes accompanying isometric tension development in intact single muscle fibers*. Biophysical Journal, Vol. 67, pp. 1965-1975, 1994.
4. T.C. Irving, J. Konhilas, D. Perry, R. Fischetti, and P.P. deTombe. *X-ray diffraction studies of cardiac muscle*. (Sin publicar). Documento interno - Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory - IL, USA, 2000.
5. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. *Molecular Biology of THE CELL*. Third Edition. Garland Publishing. Chapter 11 – Section 15, pp. 539-541. Chapter 16 – Section 53, pp. 847-861, 1990.
6. Rayment, W.R. Rypniewski, Schmidt-Base, K. *Three-dimensional structure of myosin sub-fragment-1: a molecular motor*. Science, Vol. 261, pp. 50-58, 1993.
7. M. Klein, T.E. Furtak. *Optics*. Second Edition. John Wiley & Sons. Chapter 6, 1986.
8. R. Ventura-Clapier, A.V. Kuznetsov, A. d'Albis, J. van Deursen, Bé Wieringa, V.I. Veksler. *Muscle Creatine Kinase-deficient Mice I. ALTERATIONS IN MYOFIBRILLAR FUNCTION*. Journal of Biological Chemistry 270, Number 34, pp. 19914-19920, 1995.
9. S.P.J. Brooks, K.B. Storey. *BAD 4.35 (Bound and Determined)*. Analytical Biochemistry 201, pp. 119-126, 1992.
10. P.P. Tombe, H.E. ter Keurs. *Force and velocity of sarcomere shortening in trabeculae from rat heart. Effects of temperature*. Circulation Research 66, pp.1239-1254, 1990.