



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología



**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTIVACIÓN POR
FOSFORILACIÓN COOPERATIVA DE LA CONTRACCIÓN
DE MÚSCULO DE TARÁNTULA.**

Tesis presentada por: Br. Sebastian Duno Miranda

Tutor: Dr. Raúl Padrón

Asesor(a) académico: Prof. María Carolina Pérez

Jurado: Prof. Valentina Salas

Prof. Fernando Gonzales

Caracas, Venezuela

Febrero, 2018

El Presente Trabajo Especial de Grado presentado por el Bachiller

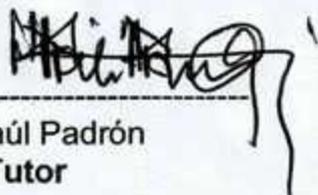
Sebastian E. Duno Miranda

Ante la ilustre **Universidad Central de Venezuela** para optar al título de Licenciado(a) en Biología y titulado:

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTIVACIÓN POR FOSFORILACIÓN COOPERATIVA DE LA CONTRACCIÓN DE MÚSCULO DE TARÁNTULA.

Fue realizado en el Instituto de Biología Experimental de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias, bajo la tutoría del **Dr. Raúl Padrón**, siendo aprobado en discusión pública por los siguientes miembros del jurado, designados por el Consejo de Escuela, quienes consideraron que cumplió con los requisitos exigidos por el reglamento universitario.

Caracas, a los 02 días del mes de Febrero del año 2018.



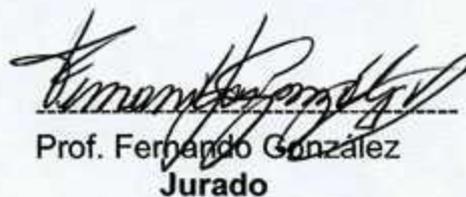
Dr. Raúl Padrón
Tutor



Profa. María Carolina Pérez
Asesor Académico



Profa. Valentina Salas
Jurado



Prof. Fernando González
Jurado



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 04/04/2018, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller **Duno M., Sebastian E.**, titular de la cédula de identidad No. 22.352.717; titulado: "Estudio del mecanismo de activación por fosforilación cooperativa de la contracción de músculo de tarántula"; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los cinco días del mes de abril del año dos mil dieciocho.


Prof. Fernando González
Director (Encargado)

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
Facultad de Ciencias Escuela de Biología
Apartado 3° 201
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

/br.-

Agradecimientos:

Estoy inmensamente agradecido y endeudado con mi familia, en especial Marlene, Antonio, Judi, Juan y los dos Jorge, sin ustedes este camino no estuviese andado.

Esta Tesis ha sido realizada en el Centro de Biología Estructural “Humberto Fernández-Morán” del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.). El CBE es un nodo del Centro de Biología Estructural del Mercosur (CeBEM). Este proyecto fue financiado por Howard Hughes Medical Institute (HHMI), EE.UU. (a RP)

Mi profundo agradecimiento al grupo de investigadores del Laboratorio de Estructura Supramolecular del CBEC (Dr. Raúl Padrón, Lic. Lorenzo Alamo, Dr. Gustavo Márquez, Ing. Antonio Pinto, Ing. Franklin Méndez) y del Laboratorio de Fisiología Celular CBB, IVIC (Dra. Pura Bolaños) por su tiempo y dedicación; así como a A. Elbakyan por prestarme repetidas veces la llave del conocimiento en momentos de crisis.

Agradecemos al Dr. John Trinick (Leeds University, Reino Unido) por su amable donación de ATP.

A ti Sonrisa, por última pero no menos importante: ¡Gracias!

Contenido

Resumen	1
Glosario de abreviaciones:	2
Introducción general	3
Antecedentes particulares	14
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Metodología	24
Medición de fuerza mecánica	24
Electroforesis en geles de poliacrilamida Urea/Glicerol (U/G).....	31
Resultados	34
Medición de la fuerza de fuerza mecánica	34
Electroforesis en geles de poliacrilamida Urea/Glicerol (U/G)	41
Discusión	42
Los músculos de las extremidades de tarántula son flexores y no extensores:	42
El estado de fosforilación de las CLR de miosina de tarántula se modifica durante la contracción muscular.....	42
El nivel de fosforilación de las CLR se modifica durante la contracción muscular según prevé el mecanismo AFC.....	44
Comparación con el nivel de fosforilación detectado en trabajos previos:	47
Relación entre los diferentes registros de fuerza mecánica presentados y el mecanismo AFC ...	48
Los resultados presentados en este trabajo apoyan la presencia del mecanismo AFC en músculo intacto de tarántula.....	53
Alcance del Mecanismo AFC.....	55
Conclusiones	62
Recomendaciones	63
Referencias	64

Resumen

Los filamentos gruesos de ciertos músculos se activan por fosforilación de las Cadenas Ligeras Regulatorias (CLR) de miosina, explicado en base al Motivo de Cabezas Interactuantes (MCI) de miosina, con el mecanismo de Activación por Fosforilación Cooperativa (AFC) propuesto para músculo estriado de tarántula. En este mecanismo la fuerza en sacudidas simples es producida por la rápida interacción de filamentos delgados activados por Ca^{2+} y un grupo de cabezas de miosina fosforiladas constitutivamente (cabezas “libres” balanceadoras) que oscilan entre estados ligados y desligados del esqueleto del filamento grueso. Al aumentar el tiempo de exposición al Ca^{2+} ocurre la fosforilación progresiva de las serinas 45 (Ser45) de las CLR tanto de las cabezas libres como de las otras cabezas que forman el MCI (cabezas “bloqueadas”), las cuales permanecen ligadas al esqueleto. Esta fosforilación, producida por la Quinasa de Cadena Ligera de Miosina (QCLM) activada por calmodulina- Ca^{2+} , potencia la fuerza producida en tétanos. Para comprobar este mecanismo lo más cercano a *in vivo*, se estandarizó una preparación que permite registrar la fuerza de la contracción de músculos estriados intactos de tarántula y determinar, durante tétanos fusionados, el nivel de fosforilación de las CLR. Usando el paradigma “sacudida pre-tetánica – tétano - sacudida post-tetánica” se demostró en este músculo el fenómeno de potenciación post-tetánica. Se encontró que el nivel de fosforilación de las CLR, en comparación con músculo relajado, se modifica muy poco al principio de los tétanos fusionados: la mono- y bi-fosforilación en Ser45 aumenta escasamente (+5 y +3% respectivamente). En contraste, al final del *plateau* ocurre un aumento importante de la mono- y bi-fosforilación en Ser45 (+23 y +20% respectivamente) concomitante con la desaparición total (-39%) de las CLR no fosforiladas. La potenciación post-tetánica y el incremento de la mono- y bi-fosforilación; escaso al principio de los tétanos fusionados pero substancial a su final, junto con la concomitante desaparición de las CLR no fosforiladas, apoyan fuertemente el mecanismo AFC propuesto para tarántula.

Palabras clave: **contracción, músculo, miosina, fosforilación, filamentos, MCI, tarántula.**

Glosario de abreviaciones:

AFC: Activación por Fosforilación Cooperativa

ATP: Adenosina Trifosfato

ADP: Adenosina Difosfato

AM: Actomiosina

MMP: Meromiosina Pesada

MML: Meromiosina Ligera

CLE; Cadena Ligera Esencial

CLR: Cadena Ligera Regulatoria

DNTB: Dinitrotiocianobenceno

ENT: Extensión N-terminal

S1: Subfragmento 1

S2: Subfragmento 2

IQ: Isoleucina-Glutamina

AEC: Acoplamiento Excitación-Constracción

RDHP: Receptores de Dihidropiridina

RRi: Receptores de Rianodina

RS: Retículo Sarcoplasmático

CaM: Calmodulina

QPC: Quinasa proteína C

QCLM: Quinasa de Cadena Ligera de Miosina

FCLM: Fosfatasa de Cadena Ligera de Miosina

U/G: Urea/Glicerol

MCI: Motivo de Cabezas Interactuantes

CL: Cabeza Libre

CB: Cabeza Bloqueada

RS: Retículo sarcoplasmático

Introducción general

El tejido muscular es el encargado de realizar la conversión química-mecánica responsable de la producción de la fuerza que permite los movimientos coordinados - voluntarios o no - que llevan a cabo una vasta mayoría de los miembros del reino animal.

Los sistemas biológicos tienden a componerse de elementos estructurales, funcionales y regulatorios y el sistema muscular no es la excepción (Craig y Padrón, 2004), aunque la presencia de tales componentes varía según el tipo de músculo y actividad asociada.

Una de las formas más generales de clasificar los tipos de músculo es según su movimiento sea voluntario o no. El tipo de músculo más estudiado es el que se encuentra directamente asociado a sistemas esqueléticos, teleológicamente asociados al movimiento voluntario. Este tipo de músculo fue denominado músculo estriado debido a la manera notable en que se encuentra ordenada su estructura interna, estabilizada por un armazón de numerosas proteínas estructurales que permiten un ensamblaje característico de apariencia estriada (Craig y Padrón, 2004).

Por otra parte, el tipo de músculo asociado al movimiento involuntario - llamado liso - mantiene su componente funcional mientras que el estructural se encuentra desorganizado (Fig. 1), con lo cual su aspecto al microscopio cambia drásticamente.

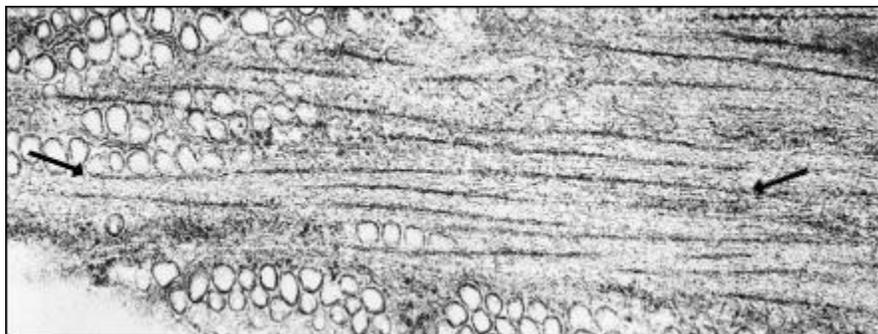


Figura 1. Micrografía electrónica de una sección longitudinal cortada cerca de la superficie de una fibra de músculo liso vascular. Un filamento de miosina de 2-3 μm (extremos

marcados por flechas) está completamente incluido en la sección. (x50.000) Modificado de Ashton y col., 1975.

Históricamente, el primer extracto proteico a partir del músculo fue llamado “Miosina” (Kühne, 1864). Luego se observó que tal fracción catalizaba la descomposición de Adenosina Trifosfato (ATP) en Adenosina Difosfato (ADP) + una molécula de fosfato inorgánico, i.e. exhibía actividad ATPásica (Engelhardt y Lyubimova, 1939), atribuyéndose el ATP como la fuente de energía de la contracción (Lohmann, 1934). Luego esta “miosina” de Kuhne, logró ser separada en dos grandes grupos - Miosina A y B - (Banga y Szent-Györgyi, 1942) con apariencia de hebras, seguidamente denominados Miosina propiamente y “Actomiosina” (AM) (debido a la presencia de otra proteína, bautizada “Actina” posteriormente) (Straub, 1942), (Szent-Györgyi, 1943); observándose en la actomiosina la primera contracción *in vitro* al adicionar ATP (Szent-Györgyi, 1942), i.e. estaban en presencia del componente contráctil (funcional) del sistema muscular (Fig. 2).

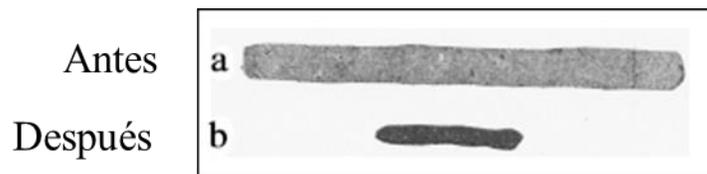


Figura 2. Contracción de hebras de Actomiosina (“Miosina B”) al añadir ATP. (a) Antes y (b) después de la adición de caldo de músculo hervido (una fuente de ATP). Modificado de Szent-Györgyi, 1942.

Poco tiempo después, gracias a los esfuerzos de Straub, se caracterizó a la Actina, como la proteína que complementa a la Miosina en el complejo de Actomiosina; ésta, tal como se encuentra en el músculo, es una proteína filamentosa compuesta de múltiples monómeros globulares llamados G-actina (Straub, 1943).

Aunado al éxito del grupo de Szent-Györgyi, la búsqueda de respuestas acerca de la biología de la contracción impulsó los primeros experimentos estructurales, difíciles de resumir en esta sección pero que abordaron el tema simplificando al músculo completo en fascículos, fibras y miofibrillas (Fig. 3a-c); estudiándolos mediante ensayos con luz polarizada, doble refracción, difracción de rayos X y microscopía electrónica.

En 1954, Huxley y Niedergerke (1954) valiéndose de microscopía de interferencia e - independientemente- Huxley y Hanson (1954) que a su vez usaron microscopía de contraste de fases, lograron observar de forma dinámica los aspectos más resaltantes de la miofibrilla: la denominada línea Z (del alemán *Zwischen* “entre”), las bandas oscuras A (por su apariencia anisotrópica al ser vistas con microscopio de luz polarizada, las bandas claras I (apariencia isotrópica) y la región más clara H (del alemán *Hell*, “claro”). Estos dos equipos caracterizaron la unidad mínima funcional del músculo estriado i.e. el sarcómero (Fig. 3e), ubicado entre dos líneas Z; y propusieron que el movimiento supramolecular de los filamentos musculares se debía a que probablemente los filamentos finos (compuestos, en general, por Actina) se deslizaban hacia adentro o hacia afuera de un arreglo paralelo y fijo de filamentos gruesos (compuestos, en general, por Miosina), propuesta conocida luego como la Teoría de los Filamentos Deslizantes, modelo funcional en el cual el acortamiento neto de los músculos al contraerse se debe al deslizamiento relativo -en cada sarcómero- de los filamentos finos a lo largo de los gruesos (Fig. 3f).

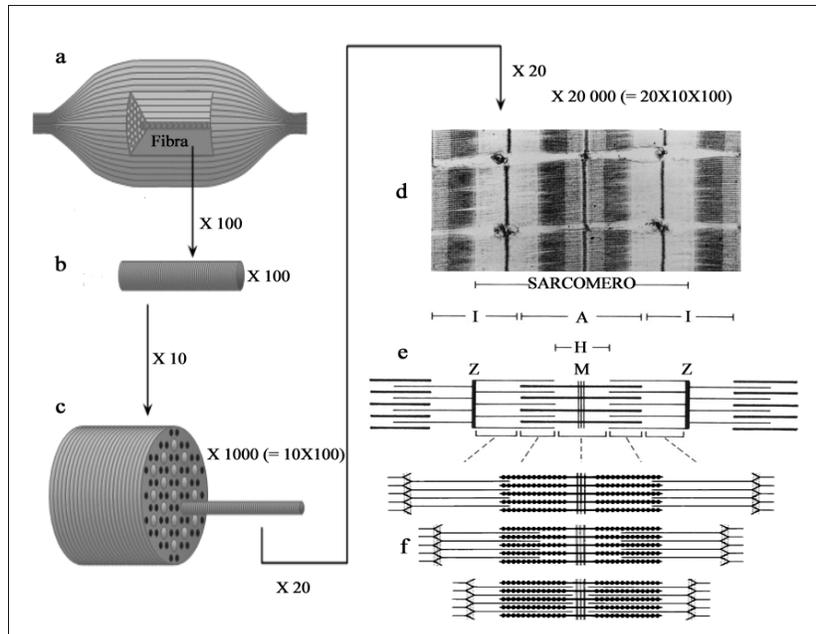


Figura 3. Anatomía del músculo estriado (a) Músculo completo; (b) Fibra (célula muscular); (c) Miofibrilla; (d) Micrografía electrónica de tres miofibrillas seccionadas longitudinalmente. (x23,000); (e) Representación gráfica del sarcómero; (f) Modelo de los filamentos deslizantes en la contracción muscular. De arriba hacia abajo, la transición desde un estado relajado al contraído. Modificado de Malmivuo y Plonsey, 1995; Craig y Padrón, 2004.

Durante algunos años la propuesta de la teoría de los filamentos deslizantes fue sometida a comprobaciones críticas las cuales soportó exitosamente, insinuándose como una explicación verosímil de la contracción muscular (Huxley, 1957). Para este momento, ya se aceptaba que la miosina podía separarse (mediante tratamiento químico o enzimático) en al menos dos fragmentos, uno de los cuales seguía uniéndose a la actina y que fue catalogado como el dominio motor, más grande, denominado Meromiosina Pesada (MMP), relegando el otro fragmento a actividad estructural, llamándolo Meromiosina Ligera (MML) (Perry, 1951). Posteriormente, Mueller y Perry (1962) reportaron que al tratar con tripsina a la MMP de forma prolongada, resultaban 2 subfragmentos característicos, uno mayor denominado Subfragmento 1 (S1) y otro más heterogéneo bautizado como Subfragmento 2 (S2).

Casi paralelamente se observó la presencia de pequeñas subunidades de miosina, producto de prolongados tratamientos con urea y otros agentes desnaturalizantes (Tsao 1953, Kominz y col., 1959, Weeds, 1969; Gazith y col., 1970); las cuales fueron sometidas a estudios energéticos y de digestión, con el fin de conocer el efecto de estos componentes de bajo peso molecular sobre la actividad ATPásica y la localización de los mismos. Tales ensayos resultaron en la diferenciación de dos tipos de cadenas ligeras, las alcalinas o esenciales (CLE) y las regulatorias (CLR). Las denominadas “alcalinas” o "esenciales" (debido a que, en una primera instancia, se perdía la actividad ATPásica) y las cadenas DNTB o "reguladoras" (por su efecto regulador en el músculo de almeja; (Szent-Györgyi y Szentkibalyi, 1973)); encontrándose que la MMP contiene, en general, dos cadenas esenciales y dos cadenas regulatorias en adición a las dos cadenas pesadas, (Weeds y Lowey., 1971; Katoh y Lowey, 1989). Más específicamente, las cadenas regulatorias constan de dos dominios conectados por una hélice, y además una extensión N-terminal (ENT) (Rayment y Holden, 1993), siendo todos importantes en la regulación. El número de aminoácidos de la ENT varía según la especie e incluye sitios de fosforilación. La suma de todos estos descubrimientos condujo a la caracterización de la miosina sarcomérica como una proteína hexamérica de gran tamaño con dos cabezas globulares S1 (cada una conformada por motivos de peso molecular definido, entre los cuales destacan el sitio de unión de actina, el bolsillo ATPásico y el dominio convertidor) y un largo bastón alfa-helical. (Fig. 4)

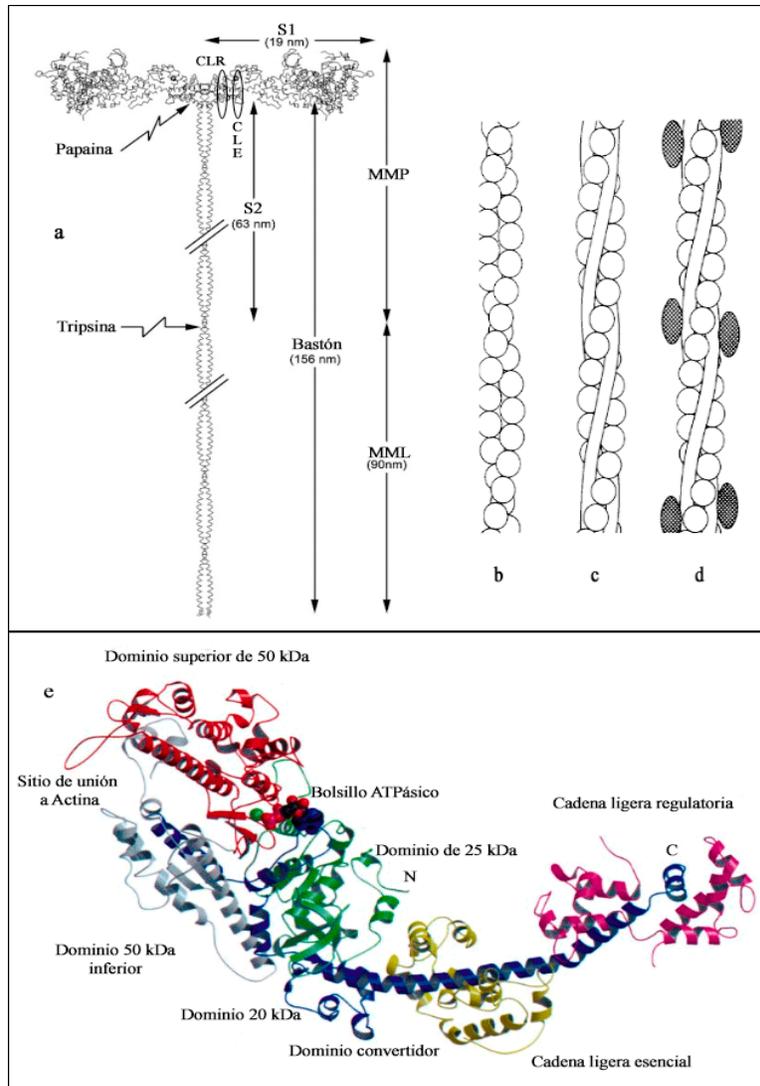


Figura 4. Diagramas esquemáticos de las moléculas de (a) miosina ilustrando la cola alfa-helical, el plegamiento de cada cadena pesada formando una cabeza globular que incluye las cadenas ligeras y esenciales, y los principales sitios de ataque enzimático con tripsina y papaína; y de la estructura del filamento fino (b) F-actina (subunidades de actina dibujadas como esferas). (c) F-actina y tropomiosina. (d) F actina y el complejo de troponina-tropomiosina (ver pág.11) (Modificado de Craig y Padrón, 2004; Katoh y Lowey, 1989). (e) Representación de cintas de la estructura atómica del Subfragmento 1 (S1) de miosina de músculo estriado de pollo determinada por Rayment y col. (1993). Este fragmento molecular tiene tres cadenas polipeptídicas, una “pesada” y dos “ligeras”, la cadena pesada está representada por tres fragmentos: una región amino-terminal a la cual se une el nucleótido, de masa molecular 25 kDa (verde), un segmento central de 50 kDa (superior: rojo e inferior: azul claro) y una porción carboxi-terminal, de masa molecular 20 kDa (azul). Las dos cadenas ligeras se encuentran plegadas en la extensión carboxi-terminal envolviendo el motivo IQ (azul): la cadena ligera esencial (amarillo) y la cadena ligera reguladora (violeta). Modificado de Holmes, 1998.

Paralelamente al estudio estructural, estudios de cinética enzimática buscaron suministrar una explicación al mecanismo molecular para los eventos que se llevaban a cabo durante la contracción muscular; llegando a ser propuesto el denominado ciclo de los puentes entrecruzados (Lymn, 1971), que inicialmente contó con cuatro etapas generales (1) disociación del complejo actina-miosina debido a la unión de ATP, (2) movimiento del puente de miosina libre mientras el ATP es catalizado en la miosina libre, (3) recombinación del puente con la actina y (4) desplazamiento de los productos. Estudios subsiguientes han mantenido los eventos principales, proponiéndose adicionalmente al menos dos etapas más relativas a la generación de fuerza de las interacciones (Geeves y Federov, 2005) (Fig. 5).

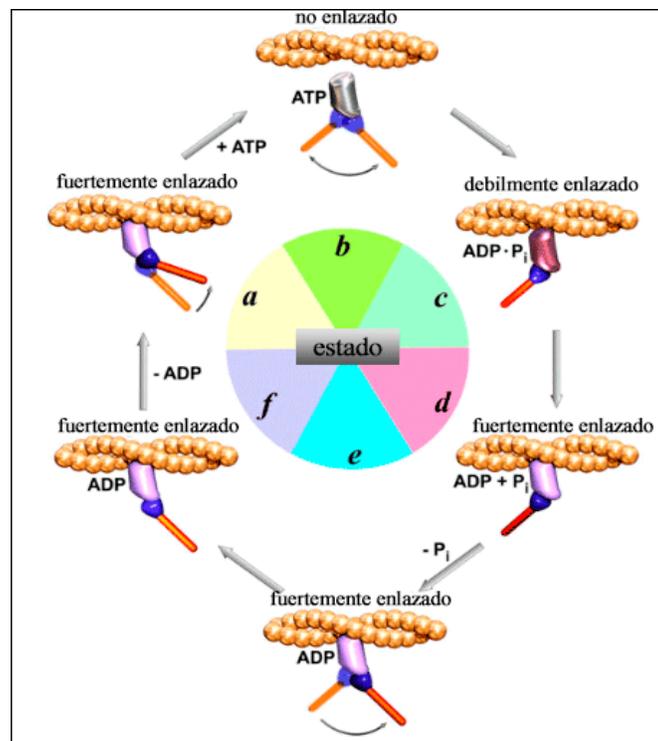


Figura 5. Esquema mecano-químico del ciclo de puentes entrecruzados. (a) Actomiosina. (b) El ATP se une logrando la rápida disociación del complejo, y el brazo de palanca es redirigido a la posición del pre-golpe de fuerza. (c) Seguido de la hidrólisis del ATP; el complejo Miosina-ADP-Fosfato inorgánico (Pi) se re-enlaza a la actina, inicialmente de forma débil y luego fuerte (d). (e) El enlazamiento con la actina induce la disociación del Pi y el golpe de fuerza. (f) El término de la oscilación del brazo de palanca es seguido de la liberación de ADP, retornándose al complejo Actomiosina, tipo rigor. Los monómeros de

actina se muestran como esferas doradas, el dominio motor es color plata en su forma libre, púrpura cuando esta débilmente unido y violeta cuando está fuertemente enlazado. El convertidor es mostrado en azul y el brazo de palanca en anaranjado. Modificado de Geeves y Federov, 2005.

La condición coordinada del movimiento muscular empieza desde el sistema nervioso, a través de la unión neuromuscular, hasta llegar al músculo produciendo el aumento de la concentración de Ca^{2+} , que es el agente intermediario entre los distintos mecanismos de regulación intrínsecos de los filamentos.

Este proceso es denominado Acoplamiento Excitación-Constracción (AEC) (Sandow, 1952) (ver Caputo, 2011) y ahora sabemos que para el músculo estriado involucra la siguiente secuencia de eventos, detallada en (Calderón y col., 2014):

- (1) Iniciación y propagación de un potencial de acción a lo largo de la membrana mioplasmática.
- (2) Propagación radial del potencial de acción a través del sistema de túbulos transversales.
- (3) Detección de los cambios propagados en el potencial de membrana en estos túbulos por parte de los Receptores de Dihidropiridina (RDHP) que son -específicamente subunidad $\alpha_1\text{Ca}_v1.1$ – Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Schneider, 1994).
- (4) Interacción alostérica de los RDHP con los Receptores de Rianodina (RRi) (canales de liberación de calcio que se encuentran en el retículo sarcoplasmático enfrentando los RDHP a la altura de las triadas en los túbulos T.) del retículo sarcoplasmático (RS) produciendo su activación; mientras que los RRi que no encaran RDHPs son activados por Ca^{2+} a través de un mecanismo de retroalimentación positivo conocido como Liberación de Calcio inducida por Calcio (Endo, Tanaka, y Ogawa, 1970).

(5) Liberación de Ca^{2+} desde el RS e incremento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en el mioplasma (Caputo y col., 1994).

(6) Activación transitoria del sistema de amortiguación de Ca^{2+} mioplasmático y el aparato contráctil. En el caso de la regulación ligada al filamento fino, en esta etapa se desencadena la desactivación de un interruptor estérico conformado por dos proteínas: el complejo de troponina y tropomiosina (Fig. 4 c-d, 6 a), complejo el cual se piensa que en ausencia de Ca^{2+} se mantiene sobre el sitio de unión a la actina de la miosina (Parry y Squire, 1973).

(7) Desaparición del Ca^{2+} del mioplasma, mediado por la unión de Ca^{2+} a la parvalbumina, su retoma a través de la ATPasa de Ca^{2+} del RS, el transporte por el intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ y su posible movimiento a las mitocondrias (Fill y Copello, 2002).

Es importante resaltar que tanto los niveles críticos de Ca^{2+} a lo largo del proceso así como las áreas de almacenamiento de este ligando pueden variar entre los tipos de músculo. (Andersson, s.f.).

Por otra parte, en la regulación asociada a la miosina se conocen dos variantes, relacionadas con los componentes de bajo peso molecular de la miosina, e.g. cadenas ligeras esenciales y reguladoras (Fig. 6).

El proceso regulatorio a partir de las cadenas esenciales (hasta ahora solo descrito para almejas) comprende la unión directa de Ca^{2+} a un sitio activo de tales cadenas, la cual provoca el desplegamiento de los dominios motores de la miosina, habilitando la unión a la actina (Kendrick-Jones y col., 1970). Respecto a la regulación por medio de las cadenas ligeras reguladoras, esta se caracteriza por requerir de una modificación postransduccional como lo es su fosforilación, previa a la habilitación de la contracción (Barany y col., 1979).

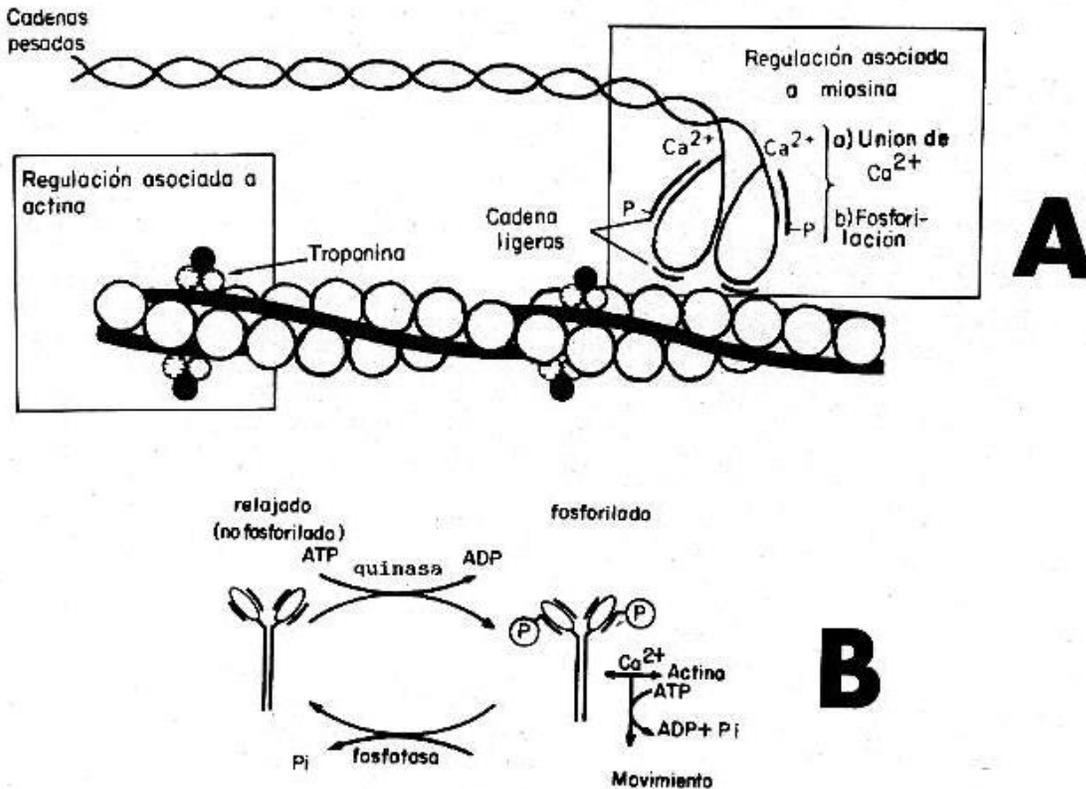


Figura 6. a. Representación diagramática de los tres sistemas de regulación descritos en músculo: regulación asociada a actina y regulación asociada a miosina (bien sea por unión directa de Ca^{2+} o por fosforilación de las CLR. b. Diagrama mostrando la regulación asociada a miosina por fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias. La contracción es potenciada por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina. Modificado de Panté y col., 1988.

En este caso, una vez aumentada la concentración de Ca^{2+} en el medio por encima de un valor umbral, entra en acción la Calmodulina (CaM) endógena que liga Ca^{2+} activando a su vez una Quinasa de Cadena Ligera de Miosina (QCLM) (Zhi y col., 2005) (ver Fig. 6); la cual entonces procede a fosforilar la CLR, acción que aumenta la disponibilidad de cabezas para el establecimiento de la unión actomiosina. Luego, al cesar el estímulo nervioso y disminuir la $[Ca^{2+}]$, una Fosfatasa de Cadena Ligera de Miosina (FCLM) endógena, que siempre se encuentra activa, se encarga de revertir el proceso.

En el mundo animal conseguimos organismos con uno o ambos tipos de mecanismos de regulación (Lehman y Szent-Gyorgyi, 1975); aunque el patrón de comportamiento mecánico general cumple las mismas relaciones longitud-tensión (Ramsey y Street, 1940), fuerza-velocidad (Hill, 1938) y las respuestas isométricas de músculos y fibras muestran similitud si los intervalos de tiempo son medidos con relación al tiempo de contracción correspondiente (Cooper y Eccles, 1930), incluyendo el fenómeno de Potenciación Post-Tetánica (PPT) descrito por vez primera en músculo estriado humano (Ranke, 1865) (Fig. 6 d).

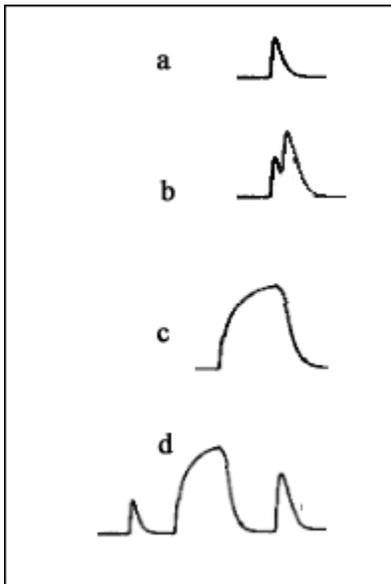


Figura 7. Diagrama de las respuestas isométricas musculares en escorpión. (a) Sacudida simple; (b) Suma de dos sacudidas simples; (c) Tétano fusionado. (d) Sacudida simple, Tétano fusionado y Sacudida Post-tetánica. Modificado de Gilly y Scheuer, 1984.

De manera especialmente interesante, en el caso de regulación dual ligada a actina y la CLR, este último mecanismo parece ser el responsable a nivel molecular de la potenciación tetánica de la contracción en músculo estriado de tarántula (Brito y col., 2011), dependiente de la $[Ca^{2+}]$ en función del tiempo, así como de la PPT.

Antecedentes particulares

Entre las cuestiones del sistema muscular que no han sido dilucidadas por completo dentro del proceso de acoplamiento excitación - contracción, uno de los temas más enigmáticos ha sido el mecanismo responsable de los cambios estructurales que experimentan los dominios motores de miosina mientras: 1) están relajados (inactivos), 2) van desde relajados a activados y 3) viceversa.

Los estudios de microscopía electrónica pioneros acerca de la estructura del filamento grueso (Huxley, 1963), condujeron a la propuesta de cómo se ensamblaban las moléculas de miosina para formar el filamento grueso de músculo. La baja resolución de estos estudios propició nuevas investigaciones acerca de la estructura detallada de los filamentos gruesos musculares en otras clases de organismos, tales como la almeja, cuyo filamento grueso presenta una simetría rotacional heptahelical, con hélices dextrógiras, en contraste con los resultados obtenidos a partir de músculo de *Limulus*, que es tetrahelical (Levine y col., 1983). A pesar de que los mapas reconstruidos disponibles eran de baja resolución (~5 nm radialmente y ~7 nm axialmente), estos resultados sugirieron que las cabezas de la miosina no se encontraban conectadas axialmente simétricas respecto al cuello del bastón, sin embargo no se lograron conclusiones definitivas (Vibert y Craig, 1983).

Para la misma época, ensayos con filamentos gruesos de músculo estriado de tarántula (Craig y Padrón, 1982) (animal con AEC dual-regulado (Lehman y Szent-Gyorgyi, 1975) mostraron que estos filamentos gruesos podían ser considerados como estructuras modelo pues presentaron mayor orden helical y menor labilidad (respecto a vertebrados), de manera que podían ofrecer mayores detalles que otras especies en la organización de las cabezas de miosina. Con una resolución de 5 nm, la principal característica que emanó de estos resultados fue la definición de un conjunto de cuatro hélices dextrógiras con espaciados

largos, formadas por las cabezas de miosina elongadas y la interpretación de una reconstrucción tridimensional en la cual una de las dos cabezas de miosina elongadas apunta aproximadamente axialmente hacia la zona desnuda, mientras la otra apunta en la dirección opuesta formando un ángulo de cerca de 45° con el eje del filamento grueso (Fig. 7). (Crowther y col., 1985).

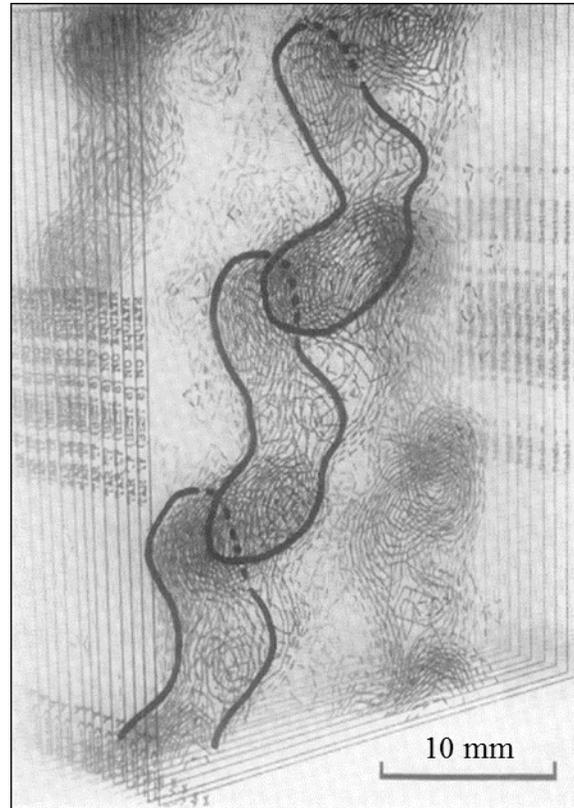


Figura 8. Mapa de contorno de la reconstrucción tridimensional de los filamentos gruesos de músculo estriado de tarántula. El contorno oscuro indica rasgos bilobulares, representando los dos subfragmentos S1 o cabezas de una molécula de miosina. La barra de escala representa 10 nm. Modificado de Crowther y col., 1985.

A su vez, mediante electroforesis zonal (separación en base a carga eléctrica neta) con Urea/Glicerol (U/G) y fosforo radioactivo (^{32}P) se propuso que el estado activado de la miosina involucraba la fosforilación (en un solo sitio) de dos especies de CLR (Craig y col., 1987); aunque luego se aclaró que se trataba de una sola especie de CLR, la cual presentó distintos niveles de mono- y bi-fosforilación (Fig. 8.) según el estado de activación (Hidalgo y col.,

motivo se ha conservado como un mecanismo para la relajación de la miosina II desde antes del origen de los animales (Lee y col., 2018) y tiene implicaciones importantes en enfermedad (Alamo y col. 2017b) específicamente la cardiomiopatía hipertrófica y dilatada (Alamo y col. 2016)

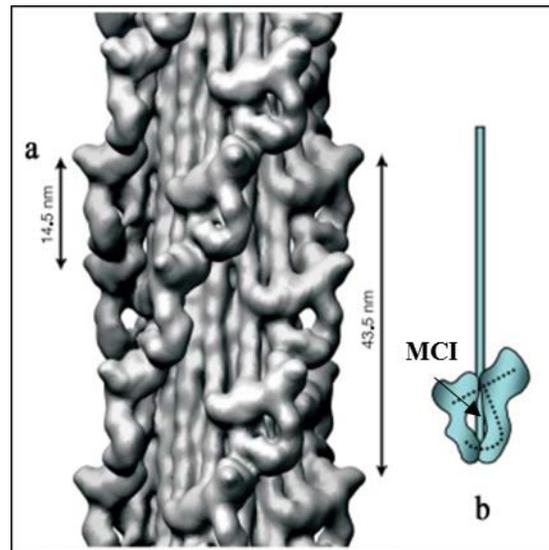


Figura 10. Reconstrucción 3D de filamentos gruesos de tarántula purificados. (a) Vista superficial de la reconstrucción 3D 4-helical. El motivo repetido, representando un par de cabezas de miosina, tiene la forma de una J inclinada. (b) Diagrama mostrando la interpretación del motivo J en términos de un par de cabezas de miosina (motivo de cabezas interactuantes (MCI) de miosina) inclinadas hacia la cola. Modificado de Woodhead y col., 2005.

A la par, Zhi y col.,(2005) reportaron que ensayos con ratones “knockout” en el gen Quinasa de Cadena Ligera de Miosina Esquelética (esqQCLM o QLCM) sugirieron que en el músculo estriado, la enzima encargada de la fosforilación de la CLR es la QCLM, activada por medio de la unión de Ca^{2+} a la proteína intermediaria calmodulina.

Ulteriormente, una vez realizados ensayos de espectrometría de masa preliminares y secuenciación de la CLR de músculo estriado de tarántula (Alamo, y col, 2008), en conjunto con el cálculo de un nuevo mapa 3D de filamentos gruesos de tarántula a 2 nm de resolución

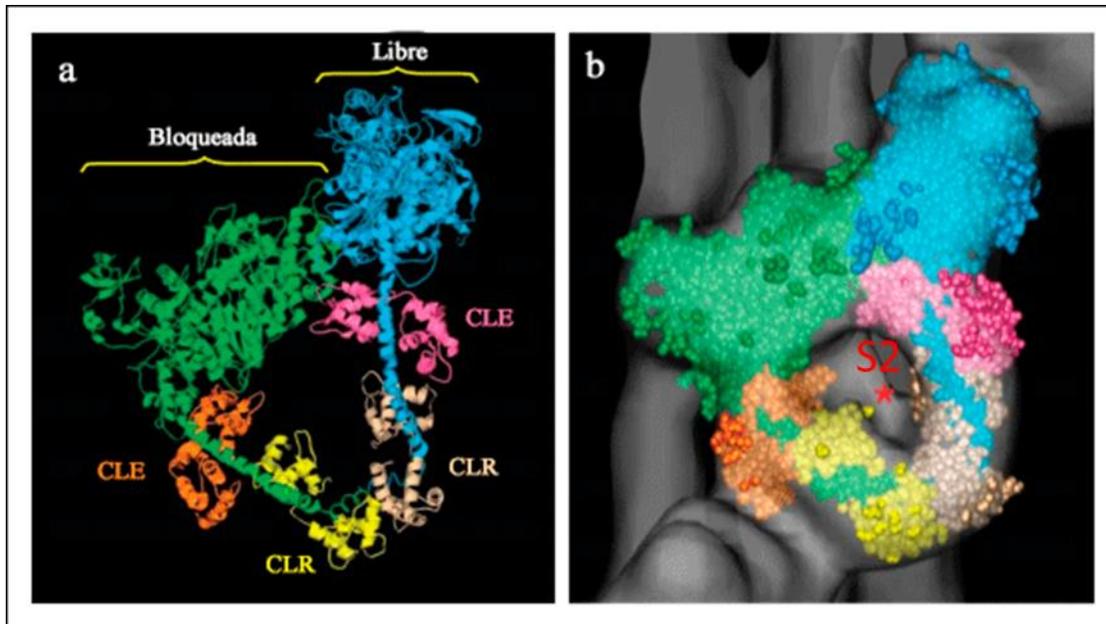


Figura 11. (a) Representación de cinta de la estructura atómica del modelo de MMP de músculo liso de pollo (PDB 1i84, (Liu y col., 2003)) (b) Mejor ajuste de la estructura atómica PDB1i84 a la reconstrucción 3D del filamento grueso de tarántula. El asterisco rojo corresponde a la densidad del subfragmento S2. Modificado de Woodhead y col., 2005.

(Alamo, y otros, 2008), se ahondó en la caracterización de la estructura supramolecular del filamento grueso, proponiendo 3 interacciones adicionales a las reportadas previamente por (Woodhead y col., 2005) y reportando que en el estado relajado el músculo estriado de tarántula presentaba fosforilación constitutiva posiblemente en la serina 35 (Ser35) de la Extensión N-terminal (ENT) de las CLR (pre-estableciendo el nivel mínimo de producción de fuerza), las cuales son capaces de interactuar rápidamente con la actina cuando se activa el mecanismo de regulación troponina-tropomiosina; mientras que la posible fosforilación de la serina 45 (Ser45) de las CLR de las cabezas libres (CLs) y bloqueadas (CBs) durante una activación más prolongada produciría el reclutamiento de cabezas adicionales, incrementando la fuerza disponible (Álamo y col., 2008).

Ensayos realizados por este mismo grupo de investigación en 2011 (Brito y col., 2011), ahondaron en el tema, identificando por espectrometría de masas los sitios de fosforilación

(Ser35 y Ser45 de la ENT) de CLR en diferentes estados de actividad y analizando las proporciones de fosforilación en los distintos estados – obtenidas mediante análisis de densidad óptica de geles U/G, a partir de cuyos resultados produjeron un modelo matemático preliminar (Pinto y Padrón, resultados no publicados). La integración de todos los resultados disponibles hasta este momento llevó a proponer el mecanismo de Activación por Fosforilación Cooperativa (AFC) en tarántula (Fig. 11), en el que factores de impedimento estérico o de accesibilidad a las serinas de cada cabeza serían responsables de controlar el comportamiento general de las mismas. En el caso de la ENT de la CLR de la CL, esta se encuentra hacia afuera del filamento y su Ser35 se encuentra en una secuencia consenso de Proteína Quinasa C (PQC) (Brito y col. 2011), estando accesible de forma continua a dicha quinasa posibilitando así la fosforilación constitutiva de las CLs en la Ser35; lo que posibilitaría cierto equilibrio en las interacciones electroestáticas (v.g. interacción CLR-CLR), capaz de inducir el balanceo browniano de estas cabezas (Alamo y col., 2008) (Vileno y col., 2011). En cambio, la serina 45 de ambas cabezas se encuentra en una secuencia consenso de una QCLM Ca^{2+} -dependiente (a través de CaM); cuyo efecto entonces solo podrá verse en el estado activado del filamento. Ahora bien, la evidencia estructural, bioquímica y proteómica antes discutida apunta a que tal fosforilación no se da de la misma manera en las dos cabezas.

Una vez la QCLM empieza a actuar, el sitio al que podría tener acceso más rápidamente es la secuencia consenso de las Ser45 de las CLR de las CLs, lo que generaría que estas se bifosforilen (Ser35 y Ser45). Se propuso entonces que esta segunda fosforilación de las CLs formaría enlaces entre los lóbulos C de su CLR y el N de su CLE (Himmel y col., 2009), causando una elongación rígida de la ENT capaz de inhabilitar el acople de la CL al eje del filamento grueso, quedando la cabeza hacia afuera mientras esté fosforilada la Ser45.

Una vez que una CL queda desprendida hacia afuera, se crea un espacio suficiente que permitiría a la QCLM acceder a la ENT de la CLR de la cabeza bloqueada de la molécula que le sigue axialmente en la hélice (hacia la zona desnuda del filamento), lo que permitiría la monofosforilación en la Ser45 de esta CB, habilitando su movimiento Browniano al desestabilizar interacciones electrostáticas homólogas a las descritas para la CL en estado relajado (estadio de potenciación tiempo dependiente). Así mismo, esta monofosforilación estaría haciendo menos compacta la ENT de la CLR de esta CB lo que se propuso prevendría el acople de su respectiva CL aun si esta está fosforilada *solo* constitutivamente.

Esto podría desencadenar un *efecto cooperativo de activación* a lo largo del filamento y hacia la zona desnuda, comenzando con la bifosforilación de una cabeza libre, seguido de la fosforilación de la CB que le sigue y ulteriormente un efecto dominó donde no se necesite la bifosforilación de cada cabeza libre hasta que todas las cabezas se encuentren disponibles (estadio de potenciación máxima). Una vez que cesa el estímulo, y dado a que la defosforilación requiere de un cierto tiempo (i.e. no es instantáneo), una vez que se alcanza la potenciación máxima (tetánica), si se produce un nuevo estímulo, se encontrarían liberadas una buena proporción de las CB, lo que explicaría la potenciación post-tetánica en términos moleculares.

Si bien en este modelo el interruptor de troponina-tropomiosina es el responsable de la contracción en primera instancia, la fosforilación de la Ser45 por la QCLM proveería de un mecanismo modulador de fuerza y de memoria en referencia al número de cabezas disponibles para la interacción con actina (aparte de la fosforilación constitutiva presente en la mayor parte de las cabezas libres) conllevando concomitantemente un aumento de la fuerza en contracciones prolongadas; conclusión apoyada además por mediciones de la velocidad de deslizamiento de filamentos de F-actina y filamentos delgados a lo largo de filamentos

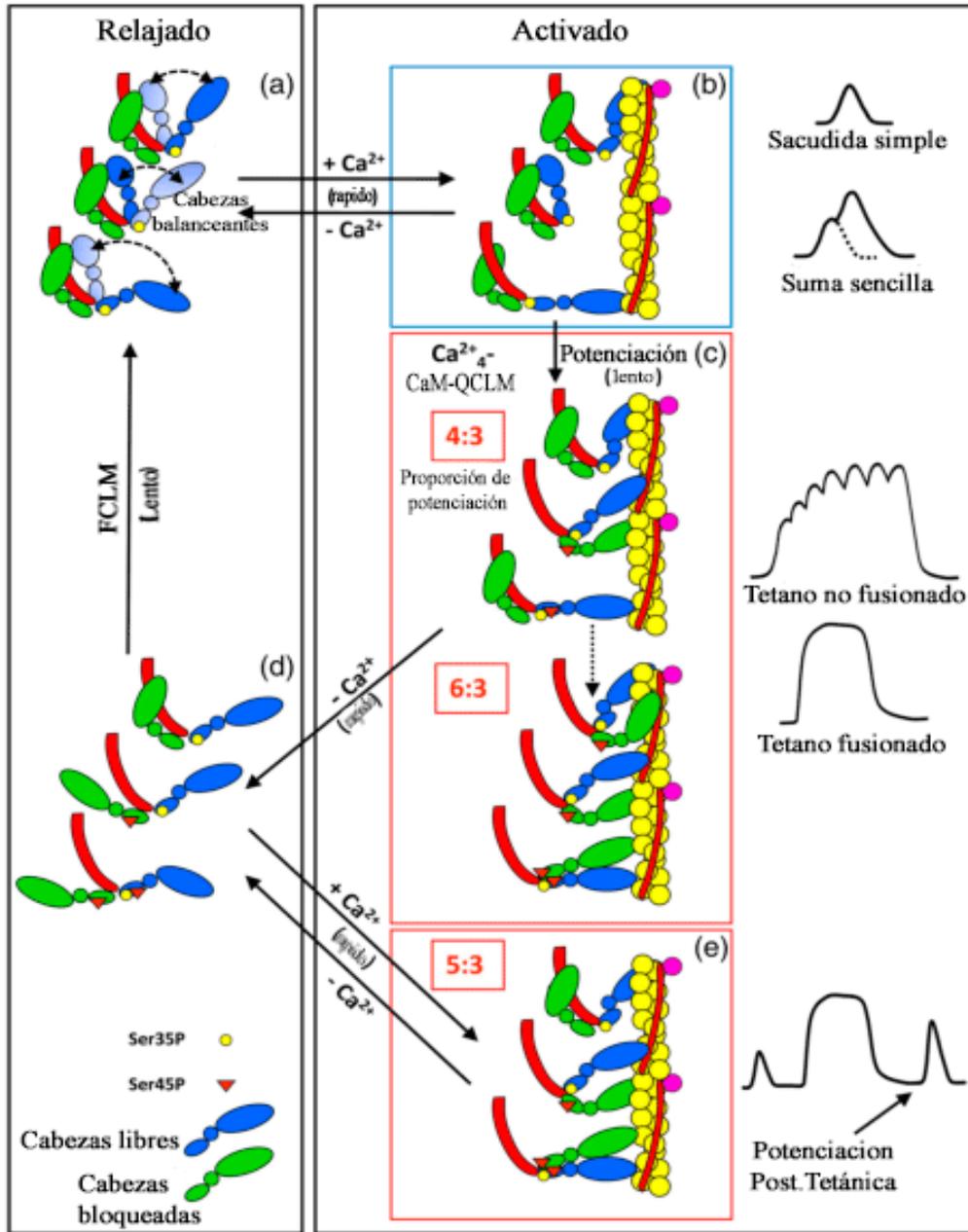


Figura 12. Representación del mecanismo propuesto para la activación, potenciación y Potenciación Post-Tetánica (PPT) de los filamentos gruesos de tarántula (a) Motivo de Cabezas Interactuantes en estado relajado, CL (azul) balanceándose y CB (verde) fija. (b) Una vez la $[Ca^{2+}]$ aumenta, se libera el interruptor troponina-tropomiosina de la actina. Las CL cuyo balanceo las haya mantenido desplegadas en ese momento pueden unirse a la actina y generar fuerza (como en las sacudidas simples). (c) Si el estímulo perdura lo suficiente, se recluta la Calmodulina (CaM) la cual procede a activar a la QCLM, la cual a su vez actúa fosforila las Serinas 45 provocando la desactivación del balanceo de las CLs y/o el desplegamiento de las CBs. La proporción de la potenciación puede ser variable, según la duración del estímulo, por ejemplo en tétano no fusionado en caso de potenciación incompleta o fusionado en caso de potenciación completa. (d) Una vez que cesa el estímulo,

la FCLM que está siempre activa y procede a defosforilar las CLR de manera tiempo-dependiente, restaurando el estado relajado inicial. (e) En el caso en que se active el músculo antes de que la FCLM lleve a cabo una defosforilación completa, estarían presentes las mismas cabezas de miosina disponibles aun cuando el estímulo sea solo una sacudida simple, generándose así la potenciación post-tetánica. Las Ser35 y Ser45 fosforiladas se muestran como esferas amarillas y triángulos rojos. Modificado de Brito y col., 2011.

gruesos de tarántula mediante la técnica de *motilidad in vitro* (Brito y col., 2011) y pruebas de actividad ATPásica (Craig y col., 1987). Los ensayos de Brito y col. (2011) fueron analizados en detalle por Sulbarán y col. (2013), confirmando lo propuesto y ampliando significativamente el abanico de evidencias favorables.

Por otra parte Espinoza-Fonseca y col. (2015) a través de estudios de dinámica molecular propusieron que la transición desde el estado relajado hasta el estado activado es consecuencia de una transición desorden-a-orden de las ENT de la CLR en dos etapas; teniendo en cuenta que los efectos de fosforilar la Ser35 y la Ser45 son distintos entre sí debido al arreglo asimétrico de las cabezas y las distintas secuencias que acompañan a cada serina. Así, la liberación inicial de las cabezas estaría controlada por un doble-interruptor, es decir, la monofosforilación de la Ser35 del ENT de CLR de CL (que es posible en CL de forma constitutiva dado que se encuentra en una secuencia consenso de QPC sin presentar impedimentos estéricos), solo interrumpiría la estructura compacta de la ENT de la CL, mas no formaría interacciones estabilizantes que conllevarían a un plegamiento interdominio de este dominio; la monofosforilación en Ser45 de CL *no fosforiladas* constitutivamente también produciría una transición desorden-a-orden parcial, mientras que la bifosforilación (Ser35 y Ser45) generaría rigidez del ENT de la CLR de CL inhabilitando el balanceo (fijando la CL en posición abierta), conclusión a la que se llegó por estudios de mecánica molecular. (Álamo y col. 2015).

Es decir, la mono fosforilación constitutiva de la CL (Ser35) conllevaría balanceo, su bifosforilación (Ser35 y Ser45) induciría liberación total de la CL (inhibición del balanceo, mayor disponibilidad de formar puentes entrecruzados porque las cabezas de miosina están más tiempo liberadas que parqueadas), i. e. potenciación por efecto de la propia CL y facilitación de la exposición de la Ser45 de CB, cuya fosforilación desestabilizaría las interacciones con el filamento, induciendo comportamiento de balanceo en CB, el cual a su vez restringiría el balanceo de CLs subsecuentes, habilitando así (de forma bifosforilación-independiente) el acceso de la QCLR a las CBs correspondientes, con lo que aumentarían paulatinamente la cantidad de cabezas de miosina disponibles para unirse a los sitios de actina (que no cambian de número) y por ende se generaría potenciación. En otras palabras, la disponibilidad de producir fuerza respecto a ambos grupos de cabezas (CL y CB) va aumentando secuencial y económicamente (respecto a consumo de ATP, v.g. ahorrando energía) de forma estímulo-dependiente, tal como ha sido propuesto por Alamo y colaboradores (Álamo, y col. 2017a)

En resumen, el mecanismo de activación por fosforilación cooperativa (AFC) se propuso para músculo estriado de tarántula en base a: (1) la estructura asimétrica del motivo de cabezas interactuantes de miosina (MCI) descubierto por crio-microscopía electrónica a partir de la organización de cabezas de miosina en el filamento grueso de músculo relajado de tarántula, (2) el nivel de fosforilación de las CLR de miosina en el estado relajado o activado por incremento de $[Ca^{2+}]$ en homogenatos de filamentos gruesos, y (3) la velocidad de deslizamiento de filamentos de F-actina y filamentos delgados a lo largo de filamentos gruesos de tarántula mediante la técnica de *motilidad in vitro*.

Panté y col. 1988 reportaron estudios relacionando la producción de fuerza en músculo de tarántula desmembrado activado por aumento de la $[Ca^{2+}]$ con la fosforilación de las CLR

(Panté et al. 1988). A diferencia de este y estos trabajos previos en otras especies, en este trabajo se estudió el mecanismo AFC directamente en músculo intacto estriado de tarántula, utilizado para los estudios estructurales que condujeron al hallazgo de los MCI de miosina. Para ello se estandarizó una preparación experimental que permite registrar la fuerza mecánica de contracción producida por músculos de las extremidades de la tarántula *Avicularia avicularia*. Esta preparación permite estudiar los eventos asociados a sacudidas simples y su sumación, series de sacudidas simples y el fenómeno de escalera o “Treppe”, tétanos no fusionados o fusionados, los fenómenos de potenciación de la fuerza de contracción y potenciación post-tetánica (PTP), así como el nivel de fosforilación de las CLR de miosina en tétanos fusionados.

Objetivo general

Obtener evidencias mecánicas y bioquímicas sobre el mecanismo AFC durante la contracción de músculo vivo de tarántula.

Objetivos específicos

1. Obtener respuestas isométricas del músculo estriado de tarántula vivo intacto.
2. Determinar el grado de fosforilación de la CLR de la miosina en el músculo estriado de tarántula vivo intacto, según cada respuesta isométrica.

Metodología

Medición de fuerza mecánica

Soluciones:

Solución salina de tarántula: 190mM NaCl, 2mM KCl, 4mM MgCl₂, 1mM Na₂HPO₄, 4mM CaCl₂; pH 7,5.

Equipos: equipo y placas de disección, estimulador SD9 (GRASS Medical Instruments, CA, USA), Cámara experimental, Transductor electromecánico AE801, Amplificador de voltaje AD521, Osciloscopio KENWOOD 20MHZ, Sistema de Adquisición pClamp 6 (Axon Instruments), Termómetro.

Captura y mantenimiento en cautiverio de los especímenes:

Las tarántulas (*Avicularia avicularia*) utilizadas para este trabajo fueron capturadas por el Sr. Isaías Vásquez, en escondites o nidos arbóreos en región de San José de Guaribe, edo. Guárico; temperatura promedio anual estimada (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, INAMEH, Venezuela): ~27,4°C; siendo el tamaño (igual o mayor a ~10 cm de longitud corporal) el único criterio de captura, una vez en cautiverio se mantuvieron en el tarantulario del Centro de Biología Estructural; temperatura promedio anual estimada: ~19,8°C (Comunicación personal Dr. R. Padrón), un cuarto techado y protegido del viento cuidando que cada tarántula tuviese agua disponible para beber y se le ofreciese alimentarse con una presa viva semanalmente (cría de ratón Cepa IVIC).

Montaje experimental:

Inicialmente se crió-anestesió la tarántula por 30-40 minutos a 4°C. Se escindió una extremidad rápidamente y se devolvió la tarántula a temperatura ambiente. Cada extremidad aislada se colocó en una placa llena de solución salina de tarántula (Schartau y Leidescher, 1983), donde se disecó el paquete de fibras denominado “G” (de “Grande”) del músculo bautizado *M flexor femoris cbensis* (Fig. 13) registrando sus dimensiones en reposo. Posteriormente se colocó esta preparación en la cámara experimental, sujeta por un extremo fijo y por el otro al transductor de tensión, el cual estuvo conectado al sistema de adquisición (Clampex) mediante un puente integrado por un amplificador modificado para introducir atenuación múltiple por (Ing. Antonio Pinto, Centro de Biología Estructural, IVIC) y un

osciloscopio a modo de sistema de control (Fig. 14, 15). Simultáneamente la preparación estuvo expuesta a flujo continuo de solución salina en la cámara experimental.

Acto seguido, se realizó la excitación de la preparación muscular según un protocolo definido (Tabla I), mediante estimulación de campo eléctrico, a través de un par de electrodos de platino rectangulares adaptados a la cámara experimental los cuales fueron conectados al estimulador (Fig. 14).

Tabla I. Protocolo de estimulación

Factor	Parámetros de estimulación	Niveles	Variable respuesta
Estimulo	Duración de c/pulso: 4 ms Intensidad de pulso: 100 V Secuencia acondicionadora: 10 pulsos a 0,3 Hz.	Sacudida Tren de pulsos Secuencia potenciadora: Sacudida (Pre-tetánica) + Tren de Pulsos + Sacudida (Post-tetánica) Secuencia de recuperación: 20 pulsos a 0,3 Hz	Fuerza (mN)

La *secuencia acondicionadora* se aplicó para todos los registros, mientras que la *secuencia de recuperación* se aplicó exclusivamente luego de *secuencias potenciadoras*.

Software utilizado para análisis: Clampfit v10.2.0.12 (Molecular Devices Corporation 1311 Orleans Drive Sunnyvale, California 94089, USA).

Limitaciones asociadas al uso de músculo completo en este estudio:

Inicialmente planeábamos realizar los registros de fuerza mecánica a partir de una sola fibra muscular aislada o en su defecto de paquetes de pocas fibras, haciendo uso de un procedimiento homólogo al reportado para aislamiento de fibra única en vertebrado (Cheng y Westerblad, 2017) pero esto no fue posible ya que las fibras de los músculos de tarántula presentaron una disposición entorchada y/o fusionada, encontrándonos que el tratar de separar grupos de fibras o de fibras individuales del paquete G implicó importantes rupturas del sarcolema de dichas fibras (evento también observado al separar los paquetes G y P, con

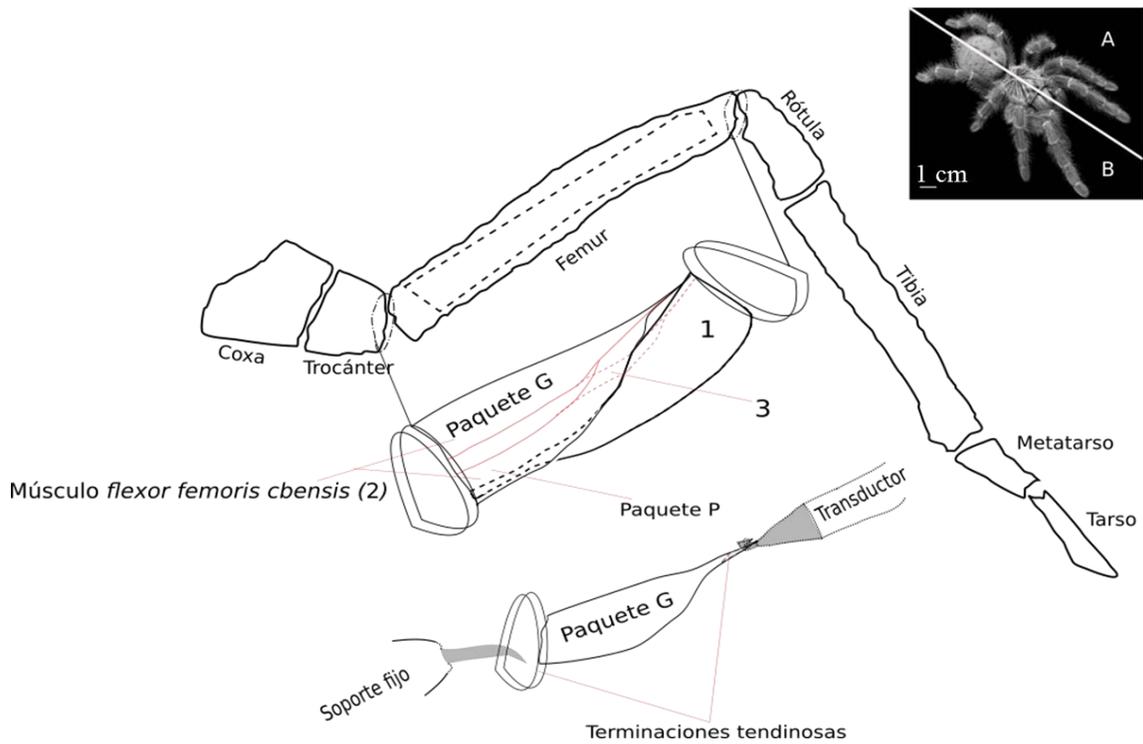


Figura 13. Representación gráfica de la disección. Se muestra la anatomía de una extremidad de *Avicularia avicularia* compuesta de siete segmentos (coxa, trocánter, fémur, rótula, tibia, metatarso y tarso), y en detalle los tres músculos de la cara anterior (respecto al lado A del inserto superior) del fémur. En este trabajo se utilizó el paquete G (grande) del musculo N°2 denominado *flexor femoris cbensis*. Este paquete una vez diseccionado fue fijado a un soporte fijo en la extremidad mayor y al transductor en la otra extremidad, como se muestra en la parte inferior de la figura. (Inserto superior Foelix, 2010).

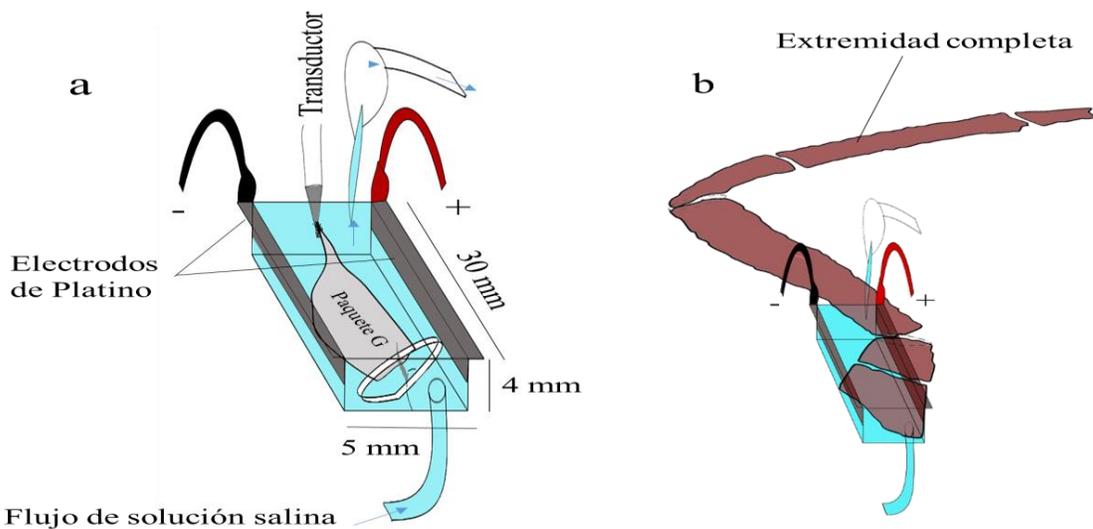


Figura 14. a. Montaje de paquete G en cámara experimental. b. Montaje de extremidad de tarántula completa utilizada solamente para los experimentos mostrados en la Fig. 23 (ver métodos para electroforesis).

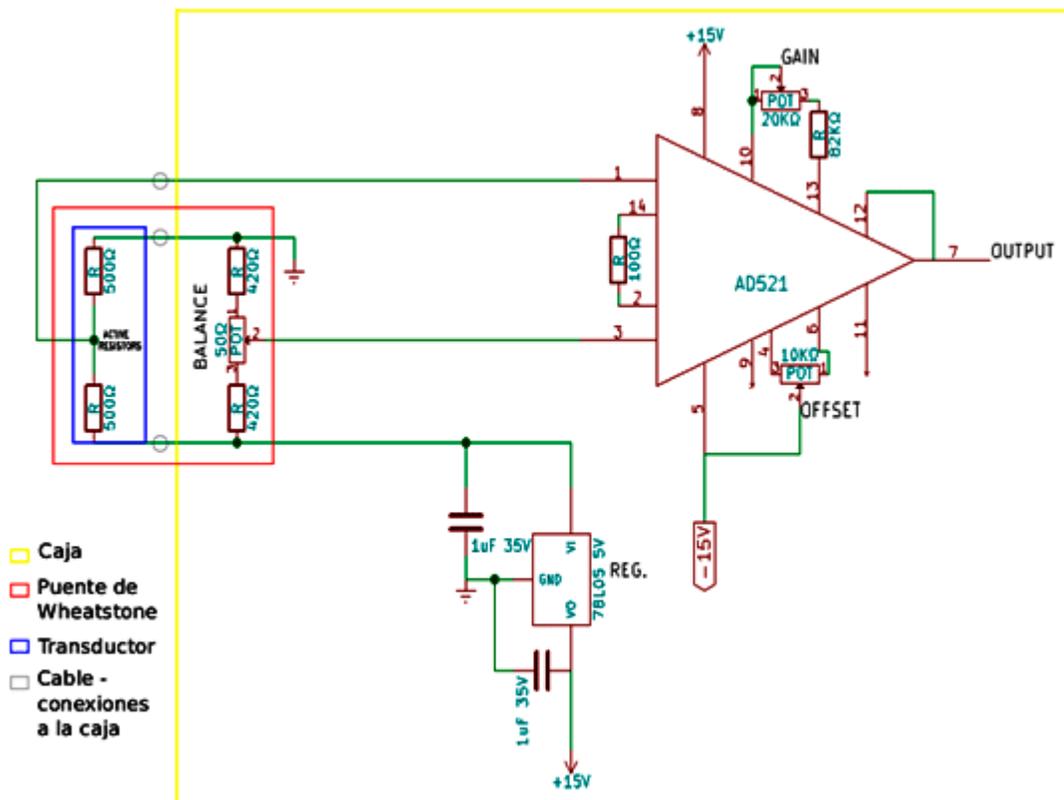


Figura 15. Diagrama del circuito electrónico del sistema de registro utilizado. (Álamo y col., 1987) (Padrón y col., 1988)

detrimento de este último), consecuencia de su conspicuo empaquetamiento y escasa delineación fibrilar, dificultad previamente reportada por Sherman y Luff 1971, y la Dra. P. Bolaños (Comunicación personal). Este problema ocasiona daño a la integridad física de los paquetes de fibras musculares así como deterioro de su capacidad contráctil. El uso de paquetes G permitió exitosamente el estudio de la actividad contráctil de estos músculos intactos, sin embargo para el análisis de los resultados obtenidos es importante considerar algunas limitaciones asociadas al uso de paquetes de numerosas fibras o músculos completos en este tipo de estudios:

1. La cámara experimental fue diseñada para estimulación eléctrica de fibras aisladas: debido a la naturaleza cilíndrica de una fibra se puede asegurar una estimulación

uniforme de todo el mecanismo contráctil. Para el caso del paquete G del *M flexor femoris cbensis* su forma y dimensiones no cumplen con estos requisitos, visto que presenta una morfología muy acuminada en el extremo distal del trocánter y truncada en el proximal, con un grosor que aumenta a modo de cono aplastado desde el extremo proximal a lo largo de su trayectoria longitudinal (Fig. 13 y 14).

2. El sistema de adquisición disponible permite registrar rangos de fuerza (± 10 V), adecuados para fibra aislada o músculos con *menor* cantidad de fibras que el paquete G.
3. La magnitud de la estimulación eléctrica disponible fue limitada ya que el estimulador eléctrico utilizado solo permitió generar pulsos de hasta 100 V, voltaje suficiente para producir estímulos supramáximos en ensayos con fibra aislada, pero tal vez no para músculos completos.
4. Presencia de poblaciones de fibras distintas dentro de un mismo músculo: En músculos esqueléticos de arácnidos se han detectado histoquímicamente y electrofisiológicamente hasta cuatro tipos distintos de fibras musculares (Maier y col., 1987), tipos estos no detectables ultraestructuralmente (Sherman y Luff 1971). Esta presencia de diferentes tipos de fibras musculares es común en músculos esqueléticos de vertebrados como en rata (Moore y Stull, 1984), humano (Bottinelli, 2000) y ratón (Calderón y col., 2009). La presencia de fibras musculares distintas en un músculo completo implica que la fuerza isométrica inducida por un único estímulo eléctrico es una combinación espacio-temporal de las fuerzas parciales producidas por cada uno de los paquetes de fibras musculares que componen a dicho músculo, reclutados y activados diferencialmente en espacio y tiempo por campos eléctricos diferentes dependiendo de la forma y micro-anatomía de los paquetes de fibras musculares del

músculo y la geometría específica de la cámara de estimulación eléctrica. En experimentos de fibra aislada la geometría rectangular de la cámara de estimulación (Fig. 14) y la de la fibra muscular (cilindro muy alargado) permiten la estimulación eléctrica simultánea de todas las miofibrillas que integran dicha fibra. Para el caso específico del músculo que usamos en este trabajo (flexor femoris *cbensis*) se trata en cambio de un músculo completo, más aún un músculo cuya morfología es muy asimétrica (Fig. 13), ciertamente muy diferente a la forma cilíndrica de las fibras musculares usualmente usadas para estos estudios. Como complicación adicional este músculo está formado por dos paquetes de fibras musculares P y G –aún no caracterizados en detalle- que están localizados de manera asimétrica (Fig. 13). Por estas razones es esperable que para un estímulo eléctrico dado se recluten de manera diferencial (todas, una parte o ninguna) de las miofibrillas de estos dos paquetes, bien sea a lo largo y/o ancho del músculo así como en su interior.

5. Cambios asociados a la ecdisis del exosqueleto: Al trabajar con fibras aisladas se pueden evaluar varias fibras de un mismo músculo individualmente sin mayor dificultad, mientras que al utilizar músculo completo ha de tenerse en cuenta que generalmente se usaban dos músculos *femoris cbensis* por día de experimentación, lo que significa que a las tarántulas (las cuales pueden sobrevivir hasta con 4 extremidades y que incluso pueden auto expulsar sus extremidades en caso de peligro (autotomía) (Lewbart, 2012); se les permitió cierto tiempo de “recuperación”, periodo en el cual es posible que -debido a la amputación de las extremidades- empezaran a segregarse hormonas relacionadas a la ecdisis del exoesqueleto, proceso a través del cual las tarántulas son capaces de regenerar sus extremidades, y durante el cual se promueven cambios bioquímicos importantes en su musculatura, en el marco de una

reorganización extensiva (Skinner, 1966) la cual implica cambios a nivel de la incorporación de aminoácidos durante el curso del ciclo de muda, mediados por alteraciones en la actividad de enzimas proteolíticas (Skinner, 1965; El Haj y Houlihan, 1987) (Yamaoka y Skinner, 1975; Mykles y Skinner, 1982) y relacionados con la tarea de abandonar el exoesqueleto previo, cuyos efectos sobre la electrofisiología de estos músculos no ha sido evaluado.

Electroforesis en geles de poliacrilamida Urea/Glicerol (U/G)

Materiales: Glicina, Tris-base, Acrilamida 30%, Glicerol, TEMED, APS, DTT, Azul de bromofenol, Agua MilliQ, TCA, Colorante Azul de Coomasie G-250, Ácido Acético glacial, Metanol, Etanol.

Equipos: Sistema de Electroforesis Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell y fuente de poder Power Pac Basic, Sistema de Imagen Bio-Rad, Spray Instant Freeze, tanque de nitrógeno líquido, Homogeneizador, Minispin Cole-Parmer, Agitador Cole-Parmer, Sonicador Cole-Parmer, Cámara de Anestesia.

Soluciones:

- Solución Rigor (100 mM NaCl, 3m M MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM PIPES, 5 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaN₃, pH 7,5)
- Buffer U/G (1,22 M Glicina (pI = 6,1) + 200 mM Tris-base pH 8,6)
- Solución Colorante (2 gr de Azul de Coomasie, 10% ácido acético glacial, 45% metanol, 45% agua)
- Solución Decolorante (10% ácido acético glacial, 45% etanol, 45% agua)

Métodos:

Obtención del músculo estriado de extremidad de tarántula:

Para el monitoreo del patrón de fosforilación en estado relajado se anestesió totalmente una tarántula con CO₂ (100%) (Lewbart, 2012) durante 4 min de exposición (tiempo de recuperación total previamente medido: >10 min), se permitió reposo de 5 min fuera de la cámara y seguidamente se introdujo la tarántula (aun totalmente sedada) en nitrógeno líquido evitando movimientos bruscos que pudiesen provocar el movimiento involuntario de las extremidades.

Para la evaluación de fosforilación justo al inicio estimado del *plateau* tetánico se repitieron los pasos de la disección y montaje del paquete G de *flexor femoris cbensis* pero sin fijar al transductor ni a la cámara (i.e la contracción fue isotónica); se aplicó un tren de pulsos de 20 Hz y 250ms de duración y un instante después (~1s) se sumergió la extremidad en nitrógeno líquido. Es necesario aclarar que se llama “inicio estimado del *plateau* tetánico” dado que en un paquete G distinto, fijo al transductor, al estimularse por 3s a 20 Hz se observó que luego de pasados aproximadamente 250 ms del inicio del estímulo, se llegaba al inicio del *plateau*. Para la evaluación de la fosforilación al final estimado del *plateau* tetánico o final del tétano se repitieron los pasos del protocolo de registro de fuerza hasta la obtención de las extremidades, luego se colocó la extremidad completa en la cámara experimental (Fig. 14 b), se aplicó un tren de pulsos de 20 Hz y 3s de duración y un instante después (~1s) se sumergió la extremidad en nitrógeno líquido. Aquí también es necesario aclarar que se habla de final estimado del *plateau* tetánico puesto que paquetes G distintos mostraron como se alcanzó un *plateau* luego de un estímulo de 3 s a 20 Hz (e.g. Fig. 18 d). Ha de tenerse en cuenta que como se utilizó la extremidad completa, los músculos estaban en su posición nativa y, si bien no han podido contraerse tan marcadamente como el caso del inicio estimado del *plateau*, si cambiaron su longitud de reposo puesto que se observó flexión de la extremidad durante el estímulo (i.e. contracción isotónica).

Nótese que para estos experimentos de evaluación del estado de fosforilación de las CLR en musculo estriado de tarántula no se llevó a cabo discriminación alguna entre paquetes G/músculos rápidos y/o lentos, y por tanto se espera que los resultados representen patrones de fosforilación promedio.

Preparación de fracción proteica:

En ambos casos, se extrajeron las patas del nitrógeno líquido y disecaron los músculos correspondientes a la sección del fémur (peso muscular estimado: 178 mg). Estos músculos se procesaron en 1,5 mL de mezcla 1:1 de Solución Rigor y TCA (cuando se utilizó un solo paquete G se usaron 600 uL) siguiendo el protocolo ya reportado por Brito y col. 2011, y comunicación personal Ing. Franklin Méndez.

Composición de gel de corrida: acrilamida 30% (1.65 mL) + buffer U/G pH 8.6 (refrigerado) 10x (1.30 mL) + glicerol (2 mL) + TEMED (3 µL) + APS 10% (5 µL)

Composición final de gel de corrida: Acrilamida 10%, Buffer U/G pH 8,6 10X 26%, Glicerol 40%, TEMED 0,06%, APS 0,02%

Composición de gel de apilamiento: H₂O MilliQ (0,87 mL) + acrilamida 30% (0,841 mL) + buffer u/g pH 8,6 (refrigerado) 10x (0,319 mL) + glicerol l (1,02 mL) + TEMED (4 µL) + APS 10% (15 µL)

Composición final de gel de apilamiento: Acrilamida 11,5%, Buffer U/G pH 8,6 10X 14,5%, Glicerol 46,4%, TEMED 0,18%, APS 0,07%

Buffer de carga: 0,54 g Urea + 0,015 g de DTT diluido con 400 µL de Buffer U/G de corrida concentrado (10X) + 200 µL de azul de bromofenol al 5%.

Corrida electroforética: 30 min a 50 V y posteriormente 5 horas a 200 V. (Comunicación personal Ing. Franklin Méndez)

Tiempo de coloración y decoloración: 1 h c/u.

Software utilizado para análisis: Gel-Pro Analyzer, v.3.0.00.00, Media Cybernetics, Maryland, USA.

Resultados

Los estudios previos sobre el mecanismo AFC en músculo estriado de tarántula estuvieron basados en evidencias estructurales (estructura de los filamentos gruesos de tarántula en estado relajado y activado *in vitro*), bioquímicas (nivel de mono- y bi-fosforilación de las CLR de miosina en estado relajado y activado en homogenatos de filamentos gruesos *in vitro*) y funcionales (velocidad de deslizamiento de filamentos delgados a lo largo de filamentos gruesos en homogenatos). En este trabajo hemos puesto a punto una preparación experimental que permite registrar la fuerza mecánica de contracción producida por un músculo completo de las extremidades de la tarántula local *Avicularia avicularia*. La preparación en cuestión permite estimular eléctricamente músculos vivos disecados con la finalidad de estudiar y caracterizar la contracción muscular en sacudidas simples (y su sumación), trenes de sacudidas y tétanos no fusionados y fusionados, así como los fenómenos de potenciación y potenciación post-tetánica (PTP). Para ello estudiamos la fuerza mecánica de contracción y nivel de fosforilación de las CLR de miosina durante tales eventos, haciendo especial énfasis en el paradigma “sacudida pre-tetánica – tétano - sacudida post-tetánica”.

Medición de la fuerza de fuerza mecánica

Para las mediciones de fuerza mecánica se decidió utilizar el paquete de mayor tamaño denominado G del músculo inicialmente identificado como “N°2” o *flexor femoris cbensis*, por su cercanía al exoesqueleto y porque presenta terminaciones tendinosas bien definidas

en ambos extremos que fueron indispensables para la fijación mecánica del paquete y/o fibras en la cámara experimental (Fig. 13).

Al evaluar las sacudidas simples producidas por paquetes G se encontraron dos tipos de respuestas con amplitud pico y fase de relajación distintas, las cuales se clasificaron provisionalmente como “rápidas” y “lentas” (Fig.16) (ver discusión).

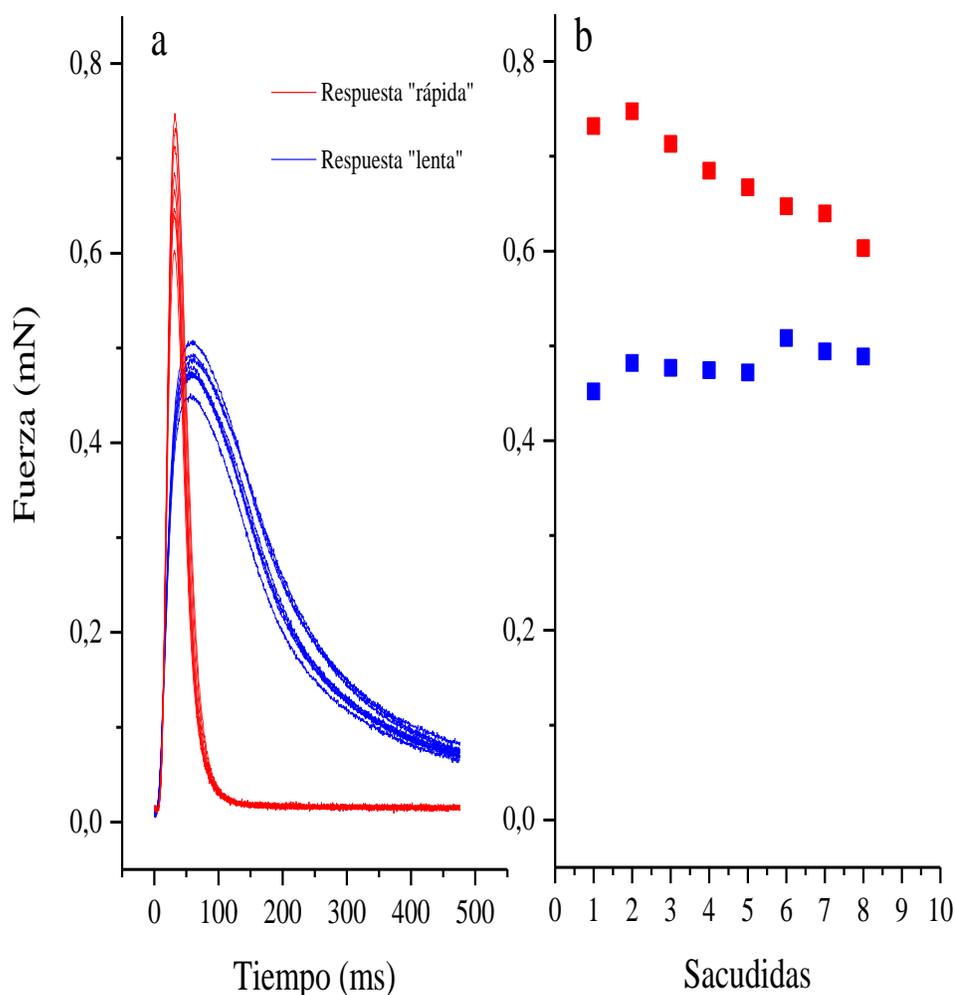


Figura 16. a. Curso temporal de la fuerza de contracción en condiciones isométricas observadas en paquetes G de músculo *flexor femoris cbensis* de tarántula: “rápida” en rojo y “lenta” en azul. b. Amplitud máxima (pico) de las sacudidas de músculos “rápidos” y “lentos” en función de un número determinado de sacudidas espaciadas 30 segundos entre sí.

Al evaluar secuencias potenciadoras en paquetes G de tendencias isométricas distintas se mantuvieron las diferencias ya descritas para el caso de sacudidas simples y adicionalmente se observó una potenciación significativamente mayor en el tipo “rápido” (Fig. 17).

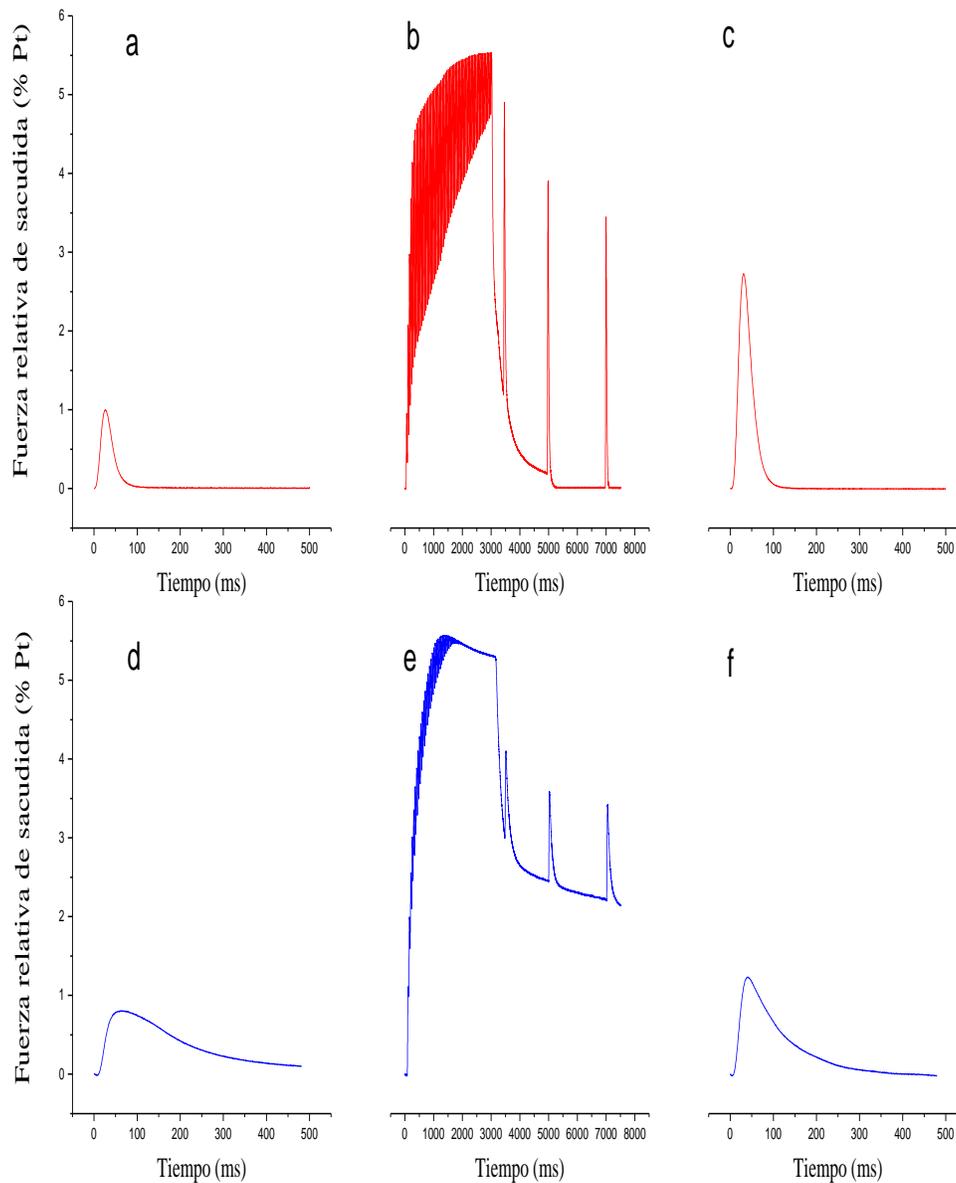


Figura 17. a-b-c y d-e-f: Registros de los cursos temporales de las fuerzas relativas de contracción para los casos “rápido” (en rojo) y “lento” (en azul).: (a,d) sacudida pre-tetánica, (b,e) tétano (duración: 3s, frecuencia: 20 Hz) y (c,f) sacudida post-tetánica; Las fuerzas mostradas están normalizadas contra la magnitud de la sacudida pre-tetánica (a) (% Pt).

Aquellos paquetes G “rápidos” que se sometieron a la secuencia potenciadora mantuvieron una fase de relajación acelerada y aunque presentaron diferencias en la capacidad de llegar a un plateau tetánico y en la magnitud pico de la sacudida post-tetánica (Fig. 18).

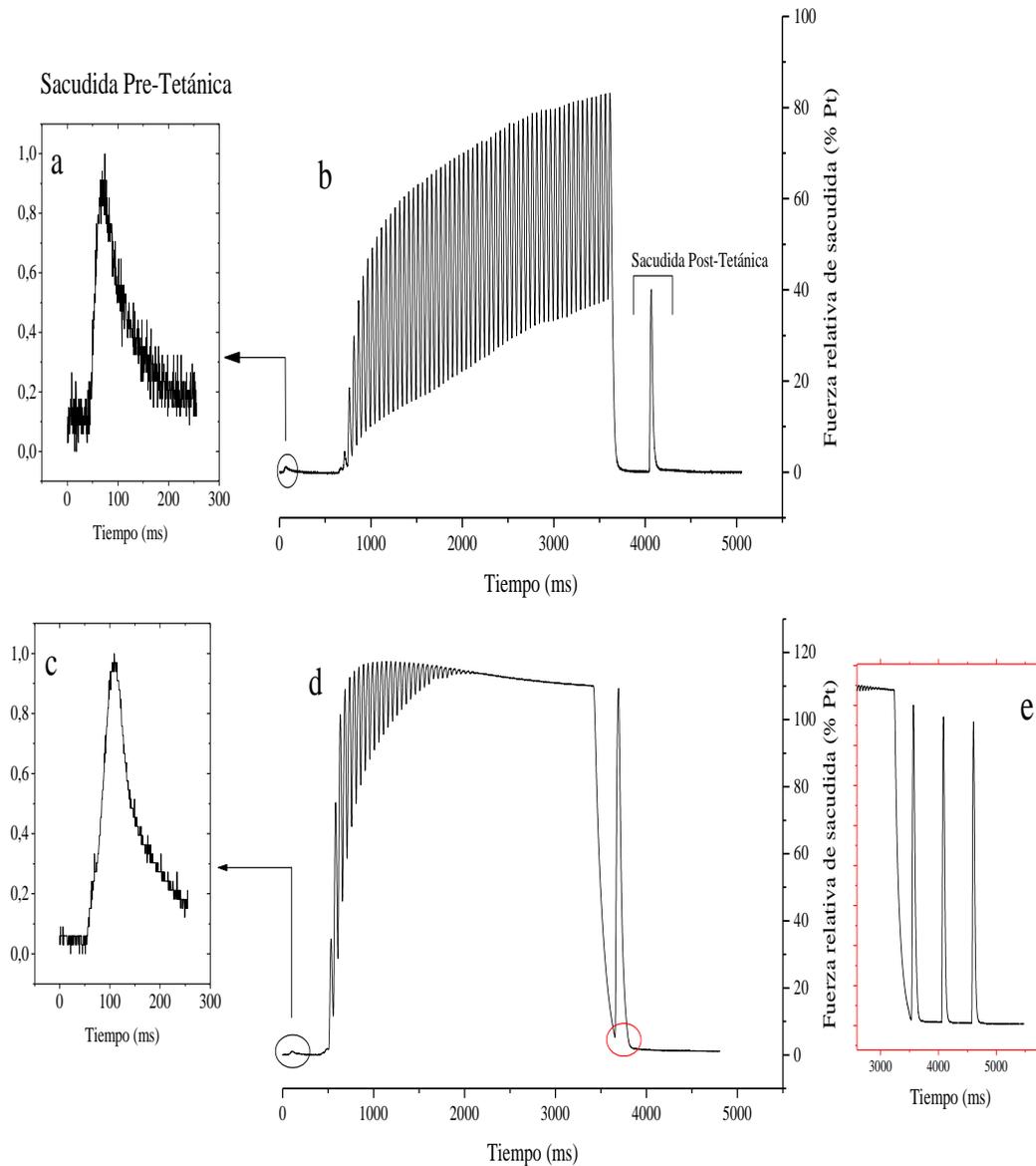


Figura 18. a-b y c-d Registros de secuencia potenciadora (sacudidas pre-tetánicas, tétanos (20 Hz, 3s) y sacudidas post-tetánicas) a la sacudida pre-tetánica respectiva, para dos paquetes G de *flexor femoris cbensis* “rápidos” distintos. El inserto (e, recuadro rojo) muestra el final de otro registro, en el mismo paquete G de los registros c y d, donde se evidencio el comportamiento post-tetánico de dos sacudidas adicionales respecto a d.

Por otra parte, los paquetes G “rápidos”, a diferencia de los “lentos”, presentaron un marcado fenómeno escalera a frecuencias tan bajas como 0,0167 Hz (c/60s). (Fig. 19)

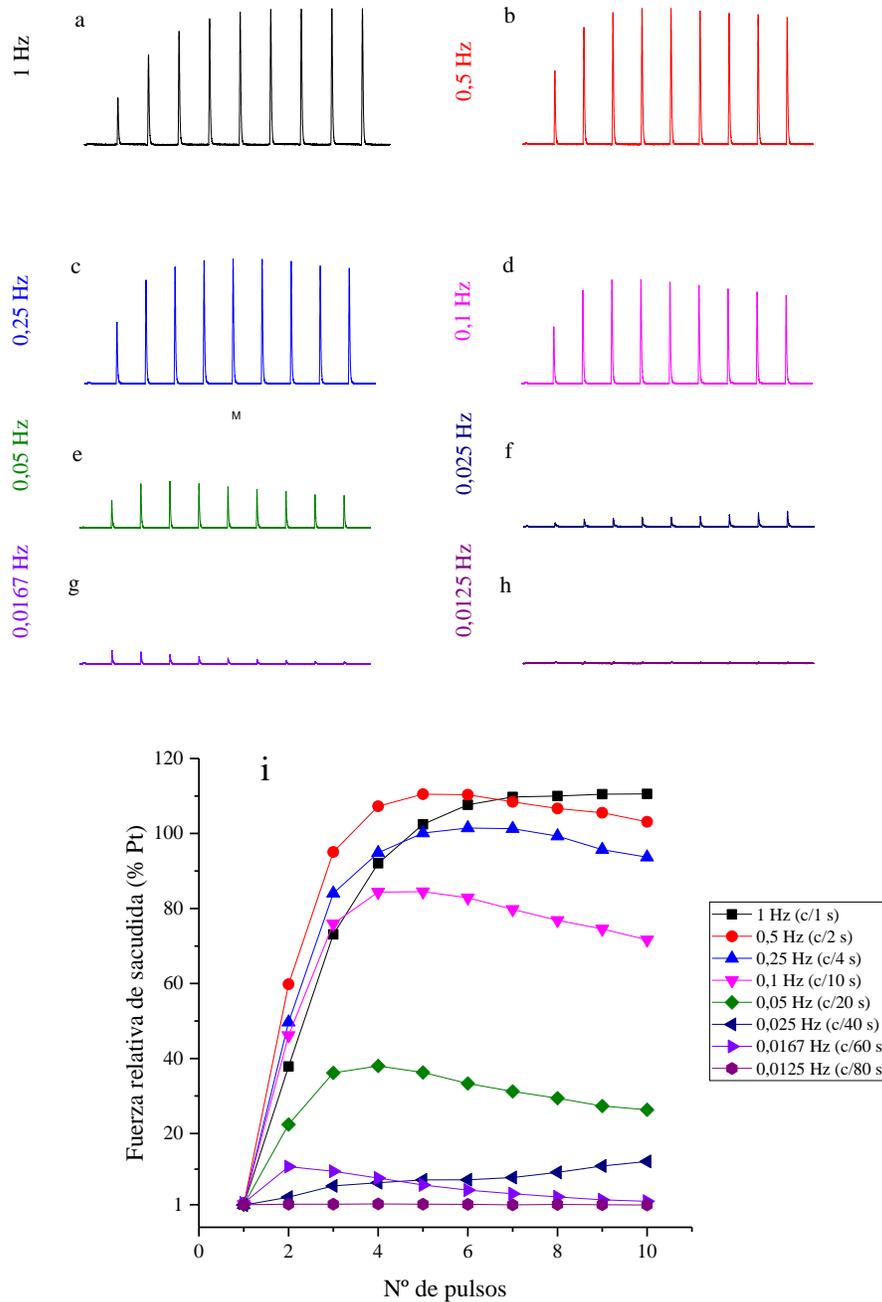


Figura 19. a-h. Conjunto de sacudidas simples a distintas frecuencias. i. Patrón de sacudidas y su respectivo curso de potenciación escalera según Nº de pulsos y frecuencia.

Para cada ensayo se registraron las dimensiones del paquete G (n=14) (fig. 20) y el valor pico promedio de las sacudidas pre-tetánicas y post-tetánicas para los paquetes G que se sometieron a secuencias potenciadoras (n=11) (fig. 21).

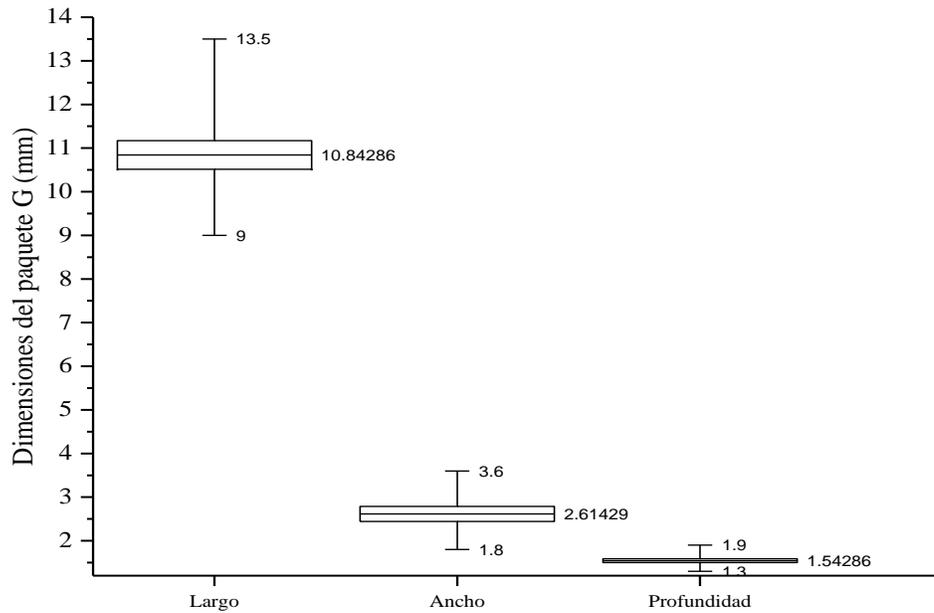


Figura 20. Dimensiones musculares de los paquetes G de músculos *flexor femoris cbensis* utilizados. (n=14). La línea central representa la media; la caja \pm error estándar; los bigotes representan máximos y mínimos.

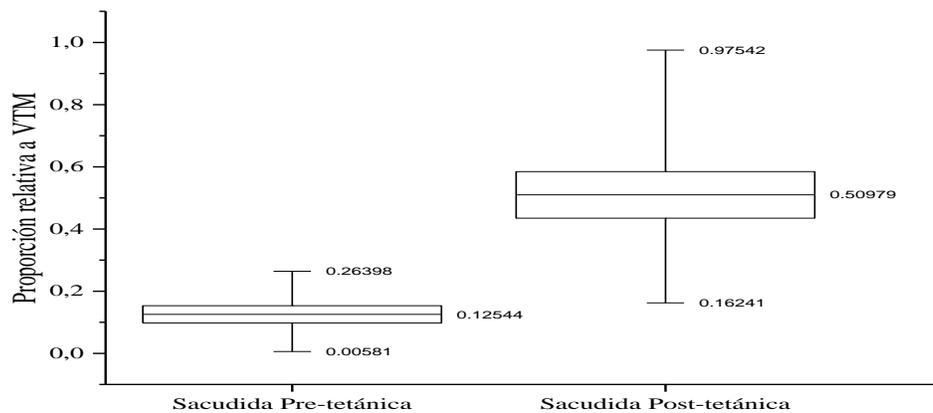


Figura 21. Conjunto total de sacudidas post y pre-tetánicas en relación a valor tetánico

máximo respectivo (VTM; Fórmula: $\frac{Sacudida}{Valor\ tetánico\ máximo}$) (n=11). La línea central representa la media; la caja \pm error estándar; los bigotes representan máximos y mínimos.

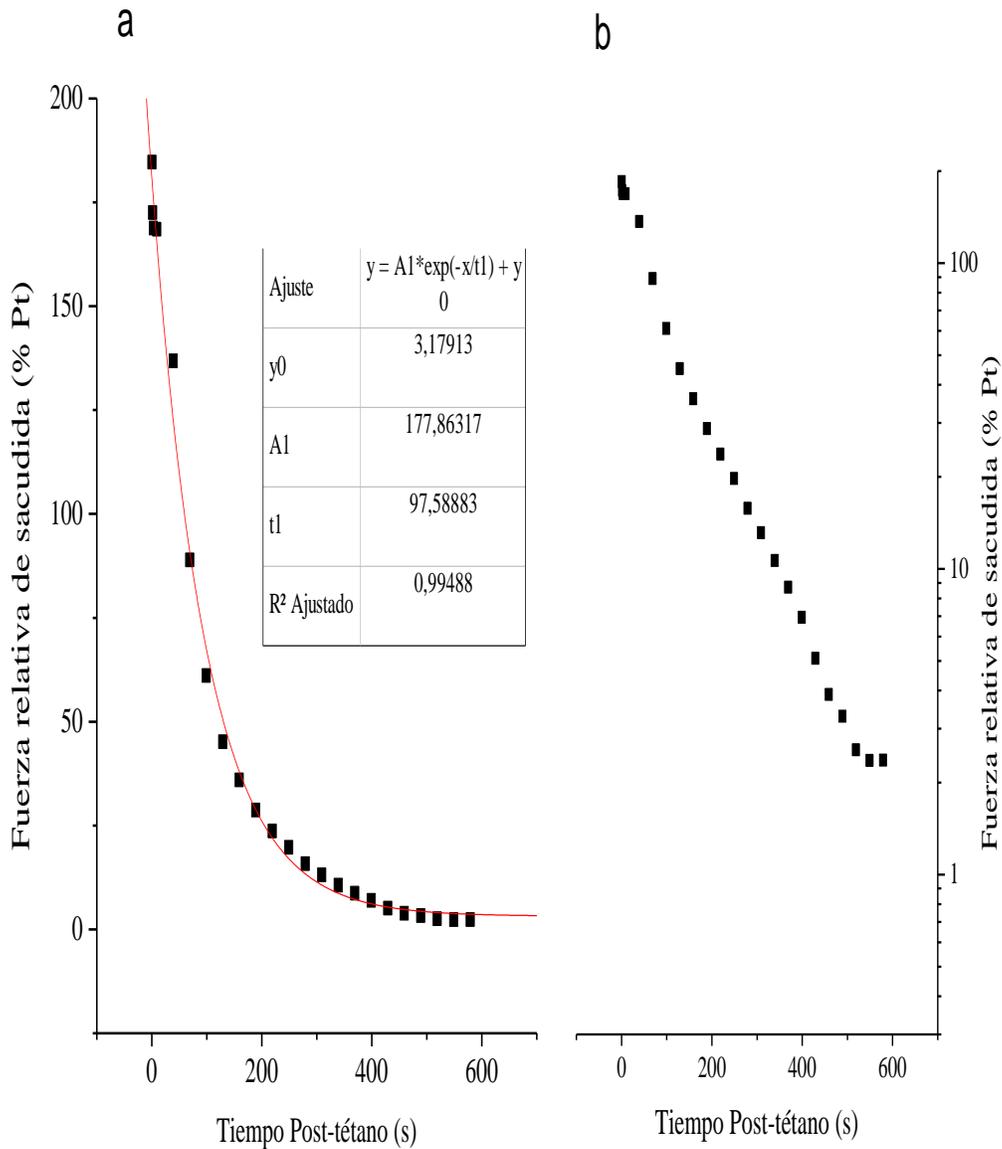


Figura 22.a. Curva del curso temporal de recuperación post-tetánica (Fig. 17) (“des-potenciación”) asociadas a tétanos de tipo rápido como los presentados en la Fig. 17 d. (en rojo curva ajustada). b. Representación de a. en escala logarítmica.

Electroforesis en geles de poliacrilamida Urea/Glicerol (U/G)

Con la finalidad de evaluar en músculo de tarántula intacto (i.e. estimulación lo más similar a *in vivo* posible), los distintos estados de fosforilación desde la relajación muscular a través de su respectiva activación y hasta el cese de la misma, se utilizaron geles U/G para estimar la fosforilación de las CLR en distintos estados fisiológicos: 1. relajado, 2. Al inicio estimado del *plateau* tetánico y 3. Justo al final estimado del *plateau* tetánico o simplemente final del tétano (Fig. 23).

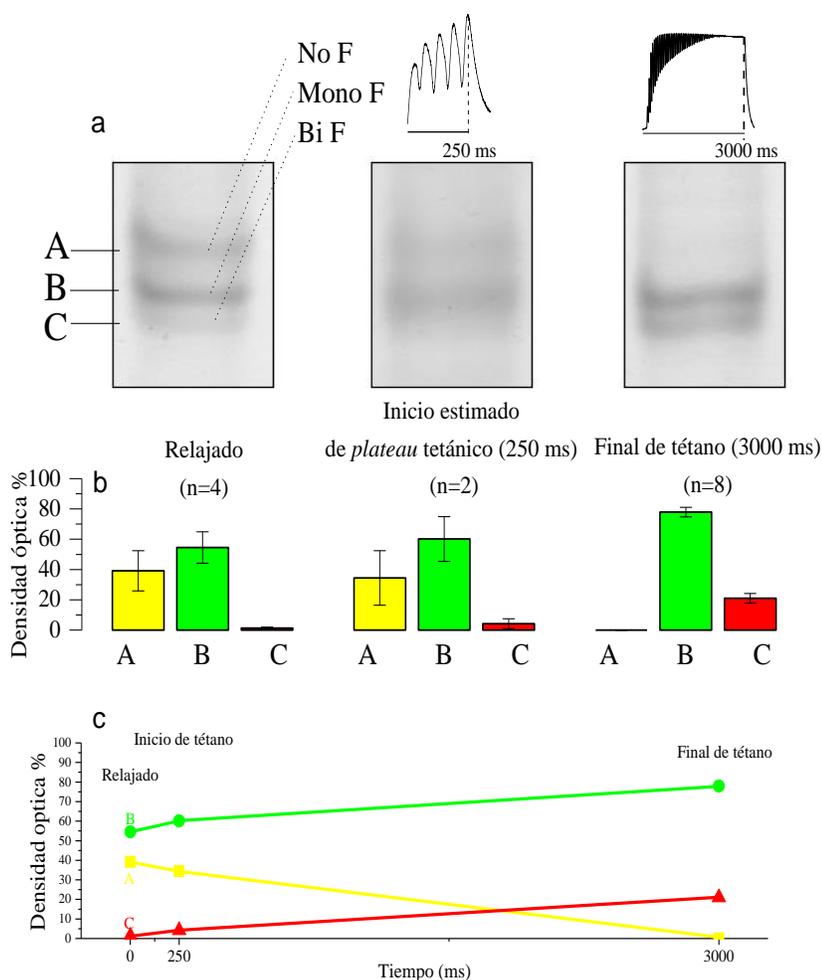


Figura 23. a. Geles U/G mostrando las tres bandas electroforéticas A, B y C para las CLR de músculo de tarántula congelado rápidamente en estado relajado y al inicio estimado y final de un tétano producido por un estímulo tetánico (20 Hz, 3s) b. Porcentaje promedio del estado de fosforilación de las CLR en los tres casos mostrados en (a) (\pm error estándar). c. Curso

temporal estimado del estado de fosforilación desde relajación hasta final de un estímulo tetánico.

Discusión

Los músculos de las extremidades de tarántula son flexores y no extensores:

Las extremidades locomotoras de las tarántulas (y arañas en general) presentan en promedio 30 músculos por extremidad, desde el trocánter hasta el metatarso (*Eurypelma spp* (Dillon, 1952) (Ruhland y Rathmayer 1978) a diferencia de los insectos, que tienen unos 10 músculos mientras que los crustáceos y escorpiones no más de 16 músculos (Ruhland y Rathmayer 1978; Barth 1985). Al estudiar la anatomía del fémur de la tarántula *Avicularia avicularia* (específicamente la cara anterior de la extremidad (siguiendo a Dillon, 1952 ver pág. 473)) no se encontraron coincidencias con la anatomía reportada previamente para otras especies de arañas (Dillon, 1952, Ruhland y Rathmayer 1978). Respecto a la función muscular, la denominación de pares musculares flexores/extensores fue justificada por estos autores en base a los sitios de inserción anatómica; sin embargo, desde 1944 se empezó a reportar la existencia de un mecanismo hidráulico como responsable de la extensión de las extremidades arácnidas, tanto en la su locomoción común como en la captura de sus presas (Ellis 1944, Parry & Brown 1959, Wilson 1970, Kropf 2013). En base a esto podemos afirmar que la actividad de los músculos de las extremidades arácnidas está exclusivamente asociada a la flexión y mantenimiento de la postura y no a la extensión de las extremidades, que es solamente hidráulica. Dadas las importantes razones anatómicas y funcionales señaladas se decidió bautizar este músculo (flexor) como Músculo *flexor femoris cbensis*.

El estado de fosforilación de las CLR de miosina de tarántula se modifica durante la contracción muscular

Consideraciones respecto a la posible existencia de fosforilación artefactual:

Para garantizar que se pudiese evaluar la fosforilación nativa en músculos de tarántula en condición relajada (punto 1) (Fig. 23 b.) se adoptó la estrategia de inducir anestesia general en el animal (Lewbart, 2012) así como el congelamiento total del animal anestesiado puesto que si se trabaja con extremidades escindidas se corre el riesgo de fosforilación asociada al aumento de calcio artefactual por la ruptura de las células musculares comprometidas en el corte, tanto de forma directa, es decir fosforilación de fibras celulares cercanas al corte por daño celular; como de forma indirecta, dado que las extremidades de tarántula *Avicularia avicularia* no admiten el aislamiento del nervio central (Ruhland y Rathmayer, 1978) que recorre la extremidad sin la destrucción concomitante de los músculos que lo rodean, por lo que este nervio permanece embebido en la preparación muscular (en el caso de extremidad completa, Fig. 14 b), susceptible a cambios de potencial en la zona asociada al corte, cambios que pudiesen suscitar la generación y subsecuente propagación de potenciales de acción a lo largo del nervio, propiciando activación muscular involuntaria y artefactual.

Sin embargo, específicamente para la estimación del nivel de fosforilación al inicio estimado del plateau *tetánico*, (Fig. 23 b) tuvimos que partir obligatoriamente solamente de paquetes G visto que se debía garantizar que el músculo se encontrara relajado antes de llevarlo al inicio estimado del plateau *tetánico*, sin permitir efectos de corte y/o disparos nerviosos involuntarios. Tal procedimiento trajo como consecuencia dos desventajas disminuyendo el rendimiento (i.e. sensibilidad de detección de fosforilación) del ensayo: 1. En estos casos solo se trabajó con el paquete G del M *flexor femoris cbensis*, es decir menos de un músculo femoral por extremidad desechándose la mayor parte del tejido muscular circundante (~ 8 músculos distintos diferentes), inutilizados durante la disección. 2. Difícilmente se obtuvo el volumen mínimo de músculo necesario para lograr su efectiva homogenización en el homogeneizador utilizado.

En cambio, para la evaluación del patrón de fosforilación justo al final del tétano (Fig. 23 b) se asumió que en vista de la índole tetánica de los estímulos utilizados, perdería importancia cualquier posible pequeña eventual fosforilación artefactual previa que sería sobrepasada por el estímulo tetánico impuesto.

Al hacer estos experimentos al principio estimado y final del plateau *tetánico* no se registró la fuerza producida para evitar el retraso que supone el desmontaje de la preparación, sin embargo visto que ya conocíamos que con ciertos trenes de pulsos de frecuencia y duración preestablecidos (20 Hz, 250 ms o 20 Hz, 3.000 ms) se producían respuestas tetánicas (inicio estimado de *plateau*, no fusionadas en 250 ms y fusionadas en 3.000 ms, Figs. 18 d; 23), simplemente confirmamos visualmente que efectivamente ocurrían.

El nivel de fosforilación de las CLR se modifica durante la contracción muscular según prevé el mecanismo AFC

Los registros isométricos “rápidos” del tipo sacudida – estímulo tetánico - sacudida, en conjunto con los patrones de bandas de CLR promedio (tanto en músculos “rápidos” y “lentos”) encontrados y los niveles de fosforilación mostrados en la figura 23 soportan las conjeturas generales del mecanismo AFC de potenciación post-tetánica relacionados a la fosforilación (Brito y col. 2011, Sulbarán y col. 2013, Espinoza-Fonseca y col. 2015, Alamo y col. 2015, Alamo y col. 2016, Alamo y col., 2017a, Alamo y col. 2017b, Biasutto y col. en preparación).

Las diferencias entre los niveles de fosforilación de músculos relajados intactos reportados por Sulbarán y col. (Fig. 24 a) y los reportados en este trabajo (Fig. 24 b) se explican porque en este último caso se evidencia un nivel de bi-fosforilación del 1% indicativo de la existencia de actividad muscular durante la anestesia por CO₂ que aplicamos

para adormecer al animal. En contraste con el efecto de otros agentes anestésicos inhalatorios como el halotano que parecen tener un efecto no específico (Ueda, 2001) v.g. pueden volver un músculo inactivo aun si se han removido los nervios (Bernard, 1875), resultados previos sugieren que el CO₂ ejerce su efecto específicamente sobre el sistema nervioso de los artrópodos y además, de manera diferencial (no afecta el sistema nervioso central (Badre y col., 2005)), por tanto, aunque las tarántulas exhibieron parálisis total, especulamos que el efecto del CO₂ no alteró la función postural de los músculos flexorales de las extremidades de las tarántulas (incluido el *M flexor femoris cbensis*) que se mantiene activa, mientras que la extensa crio-anestesia usada por Sulbarán y col. 2013 deprime totalmente la actividad postural, evitando tal fosforilación artefactual. Es importante señalar aquí que las tarántulas normalmente pueden mantenerse erguidas en reposo y sin moverse por muchísimo tiempo, en parte gracias a la acción postural de los músculos flexores de sus extremidades. La anestesia por CO₂ no modifica esta posición erguida postural, a diferencia de la crio-anestesia luego de la cual se pierde. En otras palabras durante la anestesia por CO₂ los músculos flexores se mantienen activos manteniendo la postura erguida, mientras que durante la crio-anestesia estos músculos se relajan progresivamente hasta su relajación total.

Es importante notar que el nivel de fosforilación al inicio estimado del *plateau* tetánico no se había observado previamente puesto que la activación de homogenatos por adición de Ca²⁺ no permite reproducir *in vitro* situaciones *in vivo* dado que al preparar el homogenato se destruye el mecanismo secuestrador de calcio del retículo sarcoplasmático, que recupera el nivel de [Ca²⁺] a valores nanomolares en milisegundos (Hasselbach, 1964).

Por tal razón una vez que se aumenta la [Ca²⁺] el nivel de fosforilación de las bandas (~39:60:4% fig. 23 a) coincidió con lo propuesto por el mecanismo AFC en (Brito y col., 2011), (Alamo y col.,2017) el cual predice que en cada sacudida simple debe ocurrir una

pequeña fosforilación, cuya cantidad aumentará lenta y progresivamente hasta el inicio del *plateau* tetánico), no quedando ninguna cabeza sin algún tipo de fosforilación, más específicamente, que algunas de las cabezas monofosforiladas 35 se encontrarían bifosforiladas (en serinas 35 y 45) y todas aquellas cabezas que se encontrasen no fosforiladas pasarían a monofosforilarse en Ser45 siguiendo una dinámica similar a la reportada (Fig. 23 c), resultando en la desaparición de las cabezas no fosforiladas, predicción congruente con el patrón encontrado (~0:78:21% (Fig. 23 a), el cual mantendría un efecto de potenciación por “memoria molecular” (Brito y col. 2011, Vandenboom 2017) indefinidamente si no hubiese acción desfosforiladora continua de la FCLM.

En esta tesis se estudió el comportamiento de la MLCP mediante el protocolo de recuperación (ver métodos); protocolo este que reprodujo la curva de recuperación de potenciación post-tetánica generada a partir del final de una meseta tetánica (~100% fosforilación CLR, Fig. 23) en paquete G rápidos (fig. 18 d) y mostró una tasa de decaimiento de 0,105 ($1/\tau$) y un tiempo de recuperación total de ~600 segundos (Fig. 22).

Las implicaciones en la economía energética muscular ya fueron discutida en (Brito y col, 2011) y plantean que la potenciación durante y después del tétano en el músculo de tarántula podría ser una ruta para generar más fuerza cuando se necesite, mientras se ahorra ATP cuando no. Lo que sería energéticamente favorable en un animal que pasa la mayoría del tiempo inmóvil, con ocasionales ráfagas de energía requeridas para capturar presas o eludir predadores.

Los eventos asociados a la predicción de fosforilación total en el punto 3 no había logrado ser verificada mediante estimulación *in vitro* puesto que los resultados *in vitro* no mostraron un patrón de bandas tan marcadamente activado (~100% CLR fosforiladas) (Fig. 24).

Comparación con el nivel de fosforilación detectado en trabajos previos:

En el músculo intacto *flexor femoris cbensis* las células musculares y sus compartimientos internos están intactos, incluyendo la estructura del sarcómero, mientras que en los homogenatos necesariamente se destruyen las membranas, compartimientos intracelulares y sarcómeros, mezclándose todas las enzimas presentes, ocurriendo proteólisis, etc.

Por una parte en la potenciación tetánica en músculo intacto la acción de la QLCM activada es mayor que en el homogenato, preservándose de ser monofosforiladas en Ser45 una parte de las cabezas bloqueadas (Fig. 24). Por otra parte también está presente la importante acción exhaustiva de la QLCM activada en músculo intacto, monofosforilando en Ser45 todas las cabezas bloqueadas y bifosforilando gran parte de las cabezas libres en Ser45 implicando la importancia de la presencia del sarcómero en su acción enzimática, consistente con evidencias de que la QLCM estaría ligada a los filamentos delgados (Hatch y col., 2001) y restricción esta que debería ser incluida en el mecanismo AFC.

Adicionalmente está la organización helical del filamento grueso, que sabemos por microscopía electrónica se mantiene en los filamento gruesos presentes tanto en el homogenato de músculo de tarántula (Crowther y col. 1985), así como en músculo desmembrado de tarántula como se deduce de los patrones de difracción de rayos-X (Alamo y col. 2017a, Dr. Roger Craig, comunicación personal) aunque no tenemos evidencia por ninguna de estas técnicas de dicha presencia helical en músculos de tarántula en contracción bien sea en homogenatos o músculos intactos. En la activación por Ca^{2+} del homogenato este arreglo helical de cabezas de miosina se desordena completamente (Craig

y col. 1987), sin embargo no se han hechos estudios de difracción de rayos-X en músculo de tarántula en contracción.

Una posible explicación a los resultados mostrados en la Fig. 24a (Homogenato activado) y 24b (Final de tétano) pudiera ser que durante la activación del homogenato, la QLCM no pudiera acceder a todas las cabezas bloqueadas como lo revela el alto número de cabezas bloqueadas presentes en la banda no fosforilada; mientras que durante la activación por contracción tetánica de músculo intacto ocurriría un desordenamiento tal del arreglo helical producto del estrés mecánico por estiramiento al que están sometidos los filamentos gruesos, por estar mecánicamente restringidos en el sarcómero, lo cual permitiría acceso total a la QLCM y por tanto produciría la desaparición de la banda no fosforilada, es decir todas las cabezas bloqueadas pasarían a estar fosforiladas.

Relación entre los diferentes registros de fuerza mecánica presentados y el mecanismo AFC

Aunque hay fuentes que catalogan los músculos esqueléticos de arañas como músculos estriados típicos (Foelix 2010), esta aseveración solo concierne al aspecto ultraestructural, como ya discutimos en la restricción 4 señalada previamente. Los resultados de este estudio apoyan la idea de la existencia de dos tipos predominantes de fibras musculares en los paquetes G ensayados, dentro de la cual resaltaron dos tendencias distintas en cuanto a la fuerza pico generada, la fase de relajación, la potenciación post-tetánica y “memoria molecular”, y el fenómeno Escalera o “Treppe”. A continuación se discuten estas discrepancias de acuerdo a los tipos de respuesta isométrica evaluados, i.e sacudida simple y estímulos tetánicos.

Fuerza generada

1. Sacudidas: algunos paquetes G manifestaron sacudidas simples ~25% mayores que las sacudidas de otros paquetes (Fig. 16, rojo); resultados que parecen coincidir con datos histoquímicos previos referentes a músculo estriado de araña los cuales indican que estos músculos están conformados por al menos dos tipos de fibras, unas de metabolismo principalmente anaeróbico/glicolítico y mayor actividad ATPásica que las otras, de metabolismo principalmente oxidativo (Maier, 1987).

2. Estímulos tetánicos: La magnitud tetánica generada por paquetes de ambas tendencias isométricas fue similar, evento desconcertante puesto que se esperaría que el tétano producido por las fibras de hipotético metabolismo principalmente oxidativo y menor actividad ATPasa generasen tétanos de magnitud tetánica inferior. Incluso, si se hubiesen examinado los patrones de fosforilación solamente para los paquetes G con estas características, se esperaría una actividad fosfatasa menor respecto a los paquetes G de la otra tendencia isométrica. (Ryder y col., 2007).

Fase de relajación

1. Sacudidas únicas: algunos paquetes G presentaron una fase de relajación más rápida que otros tanto en sacudidas simples (Fig. 16, rojos) como potenciadas tetánicamente (Fig. 17 a,c). Este fenómeno se ha reportado en músculos de otras especies clasificados histoquímicamente y/o electrofisiológicamente como rápidos (Hoyle, 1978; Smith, 2014). No se discutirá su relación con la fosforilación de CLR puesto que músculos rápidos que no presentan fosforilación de CLR (*M lumbricales* de ratón) (Smith y col. 2014) reportaron una fase de relajación similar, lo que pareciera indicar que esta relajación acelerada esta desacoplada de la fosforilación, sin embargo las evidencias no son concluyentes

(Vandenboom, 2017). Al respecto es de hacer notar que la fase de relajación esta mayormente asociada a la regulación por actina.

2. Tétanos: algunos paquetes presentaron una fase de relajación tetánica que pareció reflejar un solo proceso de descenso, aunque hubo paquetes en los cuales la relajación estuvo conformada por dos procesos sucesivos, una disminución rápida de la generación de fuerza y luego un cambio que conllevó un notable enlentecimiento de la relajación, (Fig.17 b, e), cambio que se especula pudo deberse a que las fibras de estos paquetes pueden poseer alta resistencia a la fatiga o “tonicidad” (contracción lenta y duradera), tal como reportó Hoyle, G. 1978 al estudiar las fibras lentas de otro artrópodo (*Locusta migratoria*); a la presencia de un tercer grupo de fibras de características netamente tónicas o que la diferencia en fase de relajación se deba a un artefacto mecánico del montaje, i.e que uno de los extremos de la preparación se desajustase a causa de la fuerza generada por el tétano (recordar que la cámara fue diseñada para fibra aislada); sin embargo las fases de relajación de las sacudidas simples (que producen muchísima menos fuerza) también se vieron enlentecidas (Fig. 17 d, f). Al respecto es de hacer notar que en esta fase de relajación el factor primordial es la regulación por actina.

Potenciación post – tetánica y “memoria molecular”

Según el mecanismo AFC propuesto para tarántula este tipo de potenciación debe su origen a una disminución de la tasa de transición de puentes entrecruzados de estado activado a relajado asociada a la fosforilación de CLR y el tiempo que pueda durar esta potenciación (memoria molecular) dependerá de la actividad específica de la quinasa/s y fosfatasa/s del músculo de tarántula asociadas a este proceso (ver discusión del mecanismo más abajo). En nuestros resultados observamos que la potenciación post-tetánica se produjo (aunque en

magnitud variable, desde 1,5X (Fig. 17 f) a ~110 veces (Fig. 18 d)) en todos los registros isométricos en los cuáles se realizó la secuencia potenciadora; al respecto se propone que tal oscilación en la potenciación se debió a una concentración de MLCK variable dentro de cada tipo de fibras que conforman al paquete G, como por ejemplo sucede entre las fibras rápidas y lentas de ratón (Ryder y col., 2007), además que pensamos que para algunos de estos registros ocurrieron algunos de los problemas expuestos en las limitantes del montaje, por ejemplo en la Fig. 18 suponemos que en el primer caso, se reclutaron menos fibras generándose un estímulo incompleto que reporto una potenciación post-tetánica de ~40 veces (Fig. 18 b), mientras que en el 2do caso se recluto una mayor proporción de fibras y se reportó una potenciación post tetánica de ~110 veces (Fig. 18 d).

Basándonos en lo anteriormente dicho concluimos que los músculos de tarántula están conformados por al menos dos tipos de fibras que manifiestan respuestas isométricas distintas, y las hemos clasificado como rápidas aquellas que registren, simultáneamente, sacudidas con una fase de relajación acelerada y una potenciación post-tetánica igual o mayor a ~3X respecto a la sacudida pre-tetánica; mientras que las que presenten una fase de relajación enlentecida y potenciación post-tetánica menor o igual a 1,5X han sido clasificadas como lentas, relevando el intervalo mayor que 1,5X y menores a 3X a músculos con población de fibras mixtas.

Fenómeno de Escalera o “Treppe”

La existencia del fenómeno de escalera (o “Treppe”) (Fig.19) encontrado en los músculos de las extremidades de tarántula *Avicularia avicularia* que reportaron respuestas “rápidas” parece indicar que la actividad de las quinasas es tal como se considera en el Mecanismo AFC (Brito y col., 2011, Alamo y col., 2017a), es decir la fosforilación comienza

a jugar un papel potenciador apenas la $[Ca^{2+}]$ aumenta por encima del umbral, i.e una pequeña fracción de MLCK empieza a activarse fosforilando una pequeña fracción de CLR en Ser45 y simultáneamente la MLCP está siempre desfosforilando, aunque a una tasa menor que la quinasa, similar a la actividad de MLCP reportada por Ryder y col., 2007 en músculo rápido de ratón.

Si bien la aparición de este fenómeno se corresponde con lo reportado en otro tipo de ensayos con músculo estriado de mamífero (Gruber, 1923, Krairup, 1981), en este caso el incremento de la amplitud pico fue ~50% mayor respecto al reportado por Krairup, (1981) con músculo de rata. Puesto que se trabajó con músculo completo podría argumentarse que puede tratarse de un problema de reclutamiento, aunque el hecho de que suceda una potenciación tan marcada a frecuencias tan bajas como las reportadas en la Fig. 19 podría sugerir que la concentración de la MLCK en músculo de tarántula es mayor que en el de rata.

La razón por la cual se llevó a cabo un protocolo estabilizador –utilizado frecuentemente en el campo de electrofisiología muscular- de 10 pulsos a 0,03 Hz previo a todos los registros realizados fue para inducir al paquete G a producir una cantidad de fosforilación tal que, para determinada frecuencia (0,03 Hz), las sacudidas generasen la misma cantidad de fuerza i.e. mismas condiciones iniciales y así poder comparar las relaciones relativas de amplitud pico:valor tetánico máximo o amplitud pico pre-tetánica : amplitud pico post-tetánica entre registros. Esto pudiera ser importante a los efectos de corregir problemas de estimulación y reclutamiento como los mencionados previamente, sin embargo en vista de que el mecanismo CPA predice que toda activación producirá un correspondiente nivel de fosforilación, estos protocolos estabilizadores pueden además alterar el nivel de fosforilación del músculo.

Por esta razón es importante destacar que entre registros distintos del mismo paquete se esperó un tiempo prudencial (10 min) de recuperación des-potenciadora por la FCLM – que está siempre activa- y que como se muestra en la Fig. 22, *luego de un plateau tetánico*, reportó ser de al menos 600 s.

No se reportan registros del tipo escalera para músculos que presentaron respuestas “lentas” puesto que, incluso a tan bajas frecuencias como las mostradas en la Fig. 19, el retraso característico en la fase de relajación de estos no permitió una llegada a la línea base lo suficientemente rápida para que no interfiriese con la siguiente sacudida, es decir, en los paquetes G lentos fue más fácil la sumación y la fusión tetánica.

Debido a que los paquetes G de *M. flexor femoris cbensis* “rápidos” se presentaron en mayor proporción (~73% vs ~27%) se decidió asignarles el peso principal al discutir estos resultados en cuanto al mecanismo AFC.

Los resultados presentados en este trabajo apoyan la presencia del mecanismo AFC en músculo intacto de tarántula

Evidencias adicionales (Espinoza-Fonseca y col. 2015, Alamo y col. 2015, Alamo y col. 2016, Biasutto y col. en preparación) han permitido afinar el mecanismo AFC originalmente propuesto (Brito y col. 2011, Sulbarán y col. 2013) tal como se muestra en la Fig. 25.

El mecanismo AFC explica como la fosforilación en dos serinas (Ser35 y Ser45) permite la liberación secuencial de las cabezas bloqueadas. El mecanismo original fue propuesto en base a la estructura del motivo de CIM PDB 3DTP de tarántula y del filamento grueso de tarántula, niveles de no-, mono- (constitutiva en Ser35, potenciadora en Ser45) y bi-fosforilación (en Ser35 y Ser45) de la CLR de miosina de las cabezas bloqueadas y libres,

y la evidencia de que filamentos gruesos de tarántula deslizaban filamentos de F-actina solo en presencia de Ca^{2+} .

Estos estudios previos en activación con Ca^{2+} fueron realizados solo en homogenatos de filamentos gruesos de tarántula a diferencia de los presentados en este trabajo que fueron hechos en músculos completos de tarántula intactos en condiciones cercanas a *in vivo*. La presencia de potenciación post-tetánica en músculos estriados de artrópodos quelicerados como tarántula (Fig. 16 y 17) y escorpión (Fig. 6, Gilly y Scheuer 1984) y el incremento de la mono- y bi-fosforilación; escaso al principio de los tétanos fusionados (Fig. 25) pero substancial a su final (Fig. 26), con la concomitante desaparición total de las CLR no fosforiladas en músculo intacto estriado de tarántula (Fig. 22), apoyan fuertemente el mecanismo AFC propuesto.

Estudios en curso permitirán dilucidar si este aumento en la fosforilación en Ser45 ocurre progresivamente, incrementándose linealmente en función del tiempo (Fig. 23c, líneas solidas de color verde y rojo) (Duno y col. en preparación) tal como lo predice dicho mecanismo así como la estructura del arreglo de cabezas de miosina en filamentos gruesos activados en homogenatos de músculo en contracción estudiados por microscopía electrónica y en músculos intactos en contracción estudiados por difracción de rayos-X.

El mecanismo AFC (Fig. 25) ha sido propuesto para músculo esquelético de tarántula en base al modelo cuasi-atómico del filamento grueso de tarántula (Brito et al. 2011, Subarán et al. 2013) y otras evidencias (Espinoza-Fonseca et al. 2015, Alamo et al. 2015, Alamo et al. 2016, Alamo et al. 2017a, Biasutto et al. en preparación). Las evidencias electrofisiológicas y bioquímicas reportadas en esta Tesis apoyan fuertemente dicho mecanismo en músculo de tarántula intacto en condiciones cercanas a *in vivo*.

Alcance del Mecanismo AFC

El mecanismo AFC puede extenderse -con algunas modificaciones- a los músculos esqueléticos de otros artrópodos quelicerados como *Limulus* y escorpión que también exhiben filamentos gruesos con cuatro hélices similares al mostrado en la Fig. 10 para tarántula. Estas modificaciones son necesarias porque, a diferencia de la miosina de tarántula que tiene una sola CLR (Hidalgo y col., 2001), las miosinas de *Limulus* y escorpión tienen dos CLR (Sellers, 1981) (Linarez, 2002). Estudios futuros permitirán dilucidar cuales serinas son fosforiladas en ambas CLR y como afecta la presencia de dos CLR fosforilables al mecanismo AFC, probablemente mas complicado que el de tarántula.

Extender el mecanismo AFC a músculo esqueletico de vertebrados anfibios como rana o mamíferos como ratón implica aún mayores modificaciones, ya que los filamentos gruesos de vertebrado: (1) exhiben tres hebras cuasi-helicales y no cuatro completamente helicoidales como tarántula, (2) contienen proteínas auxiliares como cMyBP-C que enlazan los filamentos gruesos y delgados (Luther y col., 2011) y titina no presentes en tarántula, y (3) las CLR de vertebrado solo tienen una serina fosforilable y no dos como tarántula. Además es muy importante tener en cuenta para tal extensión las diferencias morfológicas, ultraestructurales y estructurales del sistema de túbulos T y del RS así como la diferencias de los mecanismos de AEC en invertebrados y vertebrados, como discutimos a continuación:

En primer lugar, y en referencia a las bases morfológicas, ultraestructurales y estructurales del sistema de túbulos T y el RS, es importante mencionar que: (1) las fibras de músculos estriados de escorpión tienen un sistema de túbulos T geométrica y eléctricamente más simple que el de vertebrado: cada túbulo es un cilindro orientado radialmente con una abertura prominente al espacio extracelular estableciendo numerosas uniones diádicas con un extensamente desarrollado RS (Gilai and Parnas, 1972), como ha sido confirmado por

estudios ultraestructurales del músculo estriado de la cola del escorpión *Tityus discrepans* que mostraron la existencia de díadas y podocitos ubicados en los extremos de las miofibrillas entre la banda A e I (Linarez 2002); y (2) las fibras de los músculos estriados *flexor metatarsus longus* de la tarántula *Avicularia avicularia* (Guerrero and Padrón, 1992) muestran también este arreglo diádico (Guerrero y Padrón, comunicación personal), así como también las libélulas (spp.) y moscas (*Musca* sp.) (Takekura y Franzini-Armstrong, 2002). Podemos entonces concluir, en acuerdo con Gilai y Parnas (1972), que a pesar de la distancia filogenética entre artrópodos y vertebrados, las uniones diádicas T:RS de músculo esquelético de escorpión y tarántula son similares a las descritas para rana (Franzini-Armstrong, 1973).

En segundo lugar es importante notar que a pesar que el AEC ha sido caracterizado ampliamente en músculo esquelético de vertebrado (Caputo 2011) no ha sido así en tarántula, aunque si ha sido estudiado en músculos esqueléticos de otros artrópodos como quelicerados (escorpión (Gilly and Scheuer, 1984)) y crustáceos (*Balanus nubilus* (Caputo and Dipolo, 1978)), entre otros. Estos estudios dieron lugar a rasgos notorios (1) El transmisor de la placa motora de los artrópodos es glutamato(Takeuchi, 1987, Kvamme, 2018), (2) En el caso de escorpión se encontró que la dependencia de voltaje de la activación contráctil era similar a la de rana, sin embargo los músculos de ambas especies difieren en su dependencia del Ca^{2+} extracelular para la contracción: en escorpión la presencia de Ca^{2+} extracelular es indispensable para la activación voltaje-dependiente de la contracción (Gilly and Scheuer, 1984). Esta dependencia del Ca^{2+} extracelular también ha sido reportada en otros artrópodos (Padrón 1974, Caputo, DiPolo y Padrón 1974), (Caputo and Dipolo, 1978) ,(Zacharova y Zachar, 1967); (Fabiato, 1983); (Gilly y Scheuer, 1984); (Mounier y Goblet, 1987); (Tanabe y col., 1991); (Bers, 1991); (Gyorke y Palade, 1993, 1994). Así mismo, también ha sido

reportado que los receptores de dihidropiridina no interactúan estéricamente con los receptores de rianodina en el músculo estriado de artrópodo; por lo que se cree que el Ca^{2+} que entra con el potencial de acción, puede jugar el papel de activar la contracción y además activar los canales receptores de rianodina para inducir liberación de calcio del retículo sarcoplásmico. (Takekura y Franzini-armstrong, 2002).

El mecanismo AFC (Fig. 25) permite controlar la liberación secuencial de cabezas de miosina habilitando la producción de fuerza inmediatamente en sacudidas y sumaciones de sacudidas, la potenciación reversible de fuerza mecánica en tétanos y la memorización reversible de la potenciación post-tetánica, economizando energía en términos de ATP por super-relajación (Stewart y col., 2010) en artrópodos como tarántula (Naber y col., 2011) (Alamo y col., 2016) y vertebrados (Cooke, 2011). El mecanismo AFC en artrópodos quelicerados como las arañas puede haber sido modificado evolutivamente en los vertebrados, concomitantemente con una modificación de los mecanismos de AEC y estructuras del acoplamiento T:RS para permitir un control más eficiente de los niveles del Ca^{2+} mioplásmico presente.

Tabla II. Comparación del nivel de fosforilación en músculo de tarántula

Banda	Tipo de fosforilación	Músculo intacto	Homogenato de músculo	Músculo intacto	Músculo intacto	Músculo intacto
		Relajado	Ca^{2+} - Activado	Relajado	Principio estimado del <i>plateau</i>	Fin del <i>plateau</i>
A	No-F	74 ± 9 (44)	31 ± 12 (40)	39 ± 13,3 (4)	39 ± 18 (2)	0 ± 0 (8)
B	Mono-F	26 ± 9 (44)	60 ± 11(40)	55 ± 10,4 (4)	60 ± 14,8 (2)	78 ± 3,1 (8)
C	Bi-F	0	10 ± 5 (40)	1 ± 0,61 (4)	4 ± 3,4 (2)	21 ± 3,2 (8)
		Sulbarán y col. 2013	Sulbarán y col. 2013	Fig. 23	Fig. 23	Fig. 23

(± Error estándar.)

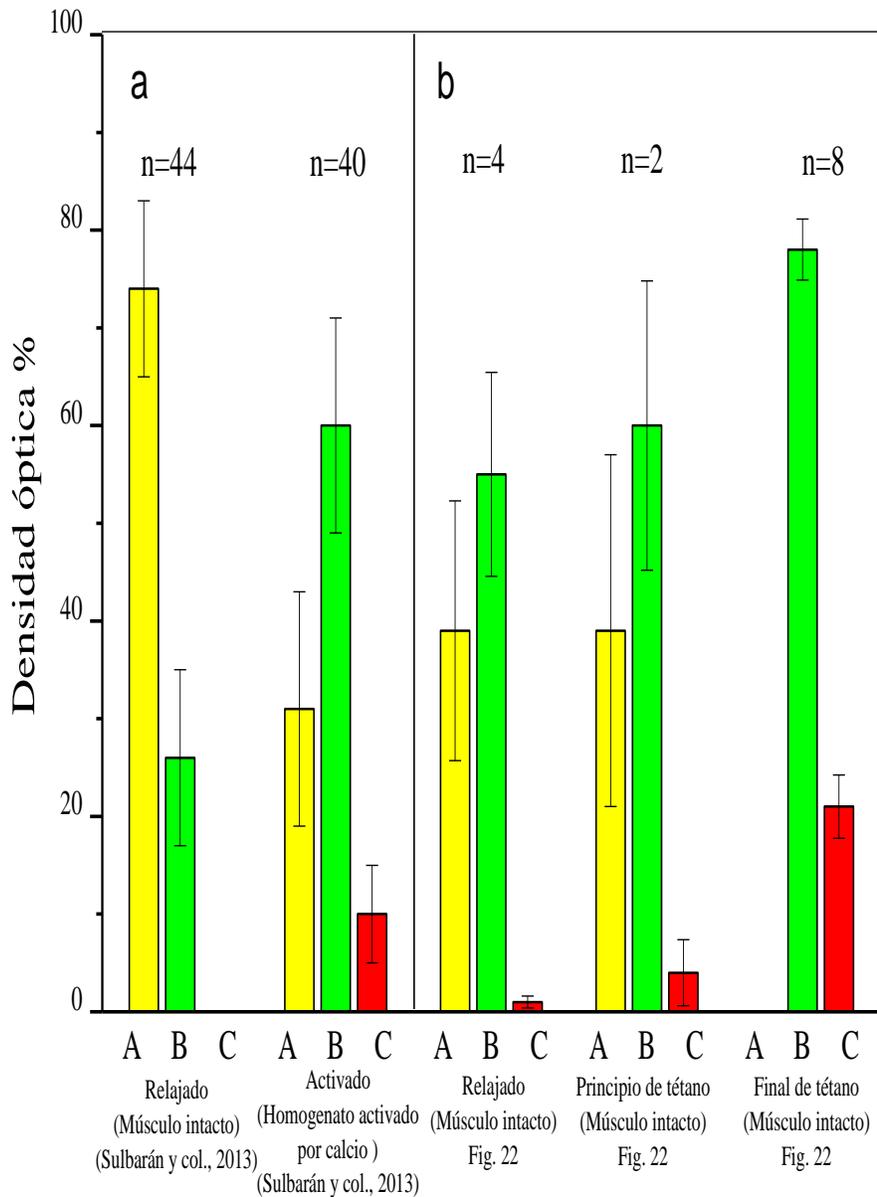


Figura 24. a. Porcentaje promedio de los estados de fosforilación de las CLR reportados por Sulbarán y col., 2013 mediante geles U/G de músculo intacto relajado y homogenato activado por calcio exógeno (Sulbarán y col. 2013) y b. Porcentaje promedio de los estados de fosforilación de las CLR reportados en este trabajo mediante geles U/G de músculo intacto relajado y músculo intacto activado eléctricamente hasta el inicio del *plateau* tetánico o su final. Las barras muestran el valor promedio \pm error estándar.

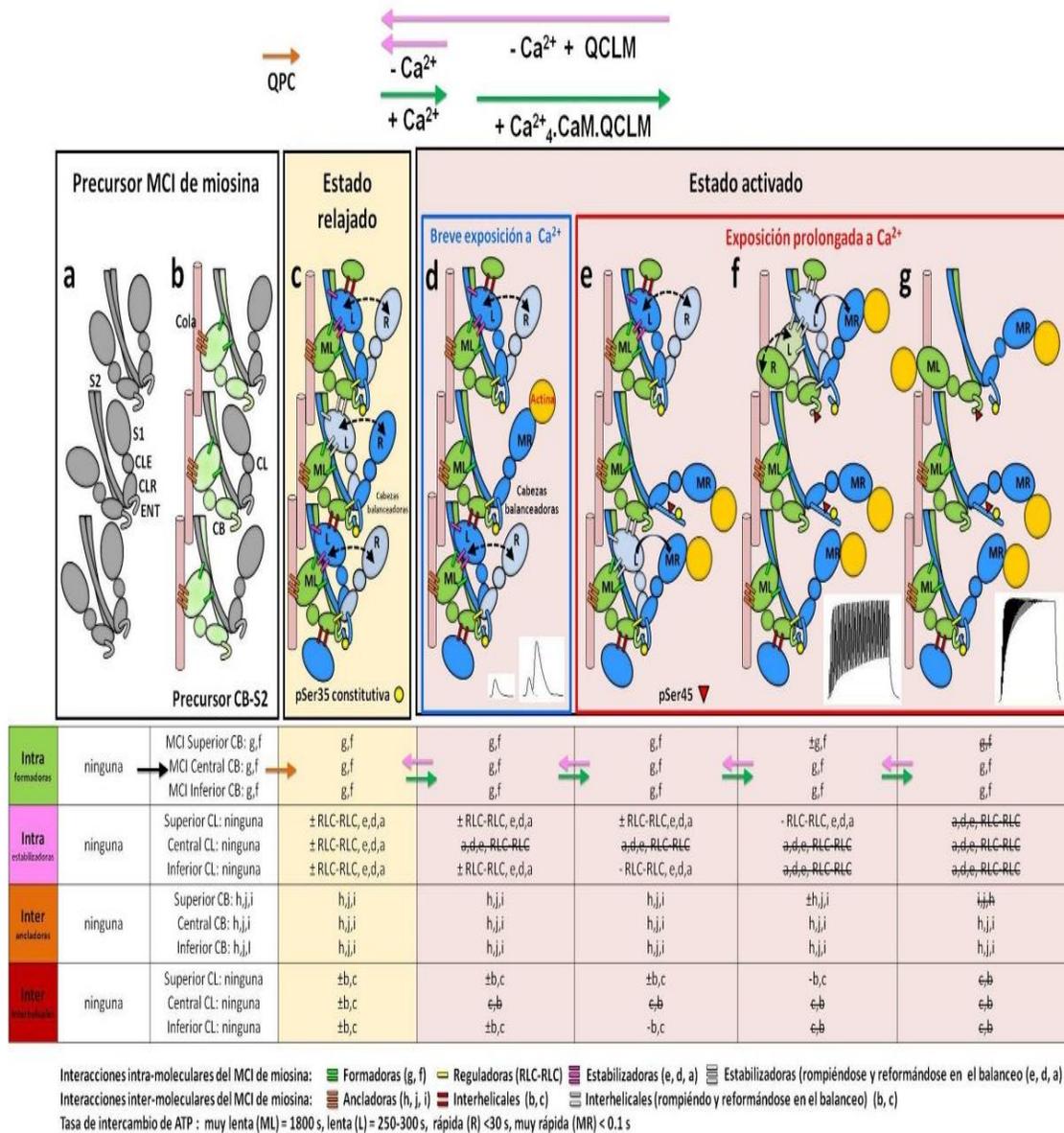


Figura 25. Mecanismo de activación por fosforilación cooperativa (AFC) propuesto para músculo estriado de tarántula. En el estado activado el mecanismo AFC (d-g) explica, en base a la estructura del MCI de miosina en estado relajado (c), el reclutamiento diferencial de cabezas libres (CL) balanceadoras (c,d) (en azul) en exposiciones breves a Ca²⁺ (d) para sacudidas simples o su sumación (insertos en “d”), o el reclutamiento progresivo de cabezas bloqueadas (CB, en verde) en exposiciones prolongadas a Ca²⁺ (e-g) para tétanos no fusionados (f) (inserto) o fusionados (inserto) (g). En la parte inferior se muestra la tabla de formación y eliminación de las interacciones del MCI de miosina intramoleculares (formadoras, reguladoras y estabilizadoras) e intermoleculares (ancladoras e interhelicales) para el mecanismo AFC mostradas con barras de diferentes colores en b-g. QPC: Quinasa proteína C. Modificado de Alamo y col. 2017.

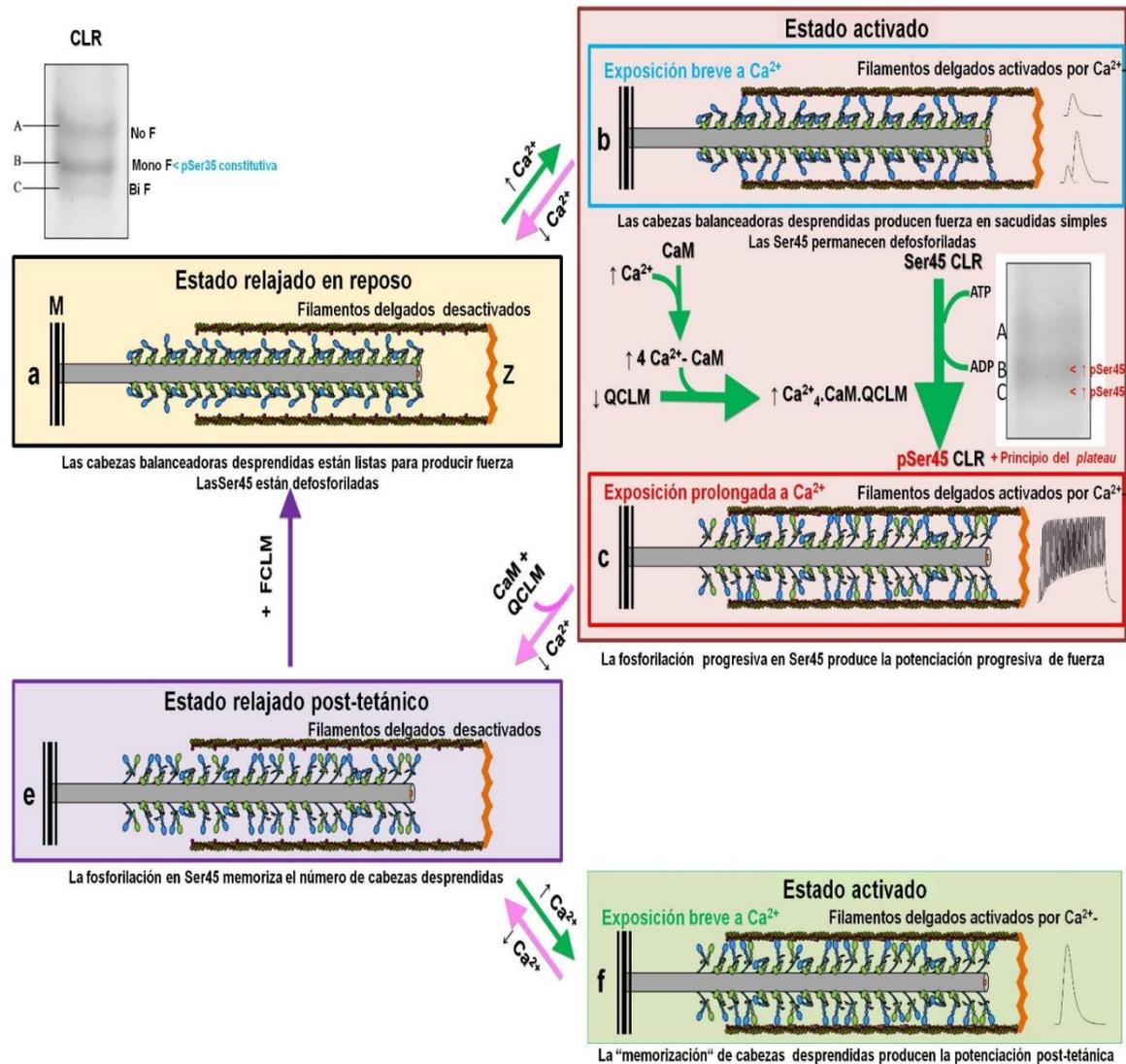


Figura 26. Mecanismo de contracción del sarcómero de músculo estriado de tarántula basado en el mecanismo AFC mostrado en la Fig. 25. En la figura se muestra la mitad de un sarcómero simplificado (formado solo por un filamento grueso y dos delgados entre la línea M y Z) en estado relajado en reposo (a) y activado por vez primera (b, c). En el estado relajado en reposo (a) las cabezas balanceadoras desprendidas están listas para producir fuerza. Las Ser45 en el estado relajado en reposo están defosforiladas como se muestra en el gel en la parte superior izquierda. Al aumentar brevemente la $[Ca^{2+}]$ por encima del umbral (b) (recuadro azul) estas cabezas balanceadoras desprendidas producen fuerza en sacudidas simples o sumación de sacudidas simples (inserto derecho) con los filamentos delgados activados por Ca^{2+} a través del mecanismo regulador de troponina y tropomiosina. Al extenderse la exposición a una $[Ca^{2+}]$ por encima del umbral se activa la QCLM a $Ca^{2+}_4 \cdot CaM \cdot QCLM$ que fosforila secuencialmente en Ser45 las CLR de las cabezas libres y

bloqueadas según el mecanismo AFC (Fig. 24), como se muestra en el gel del lado derecho obtenido al principio de un tétano no fusionado, mostrado en el inserto en (c) (recuadro rojo). Esta fosforilación en Ser45 al principio del tétano produce una potenciación parcial de fuerza ya que solo se recluta un número de cabezas del total de cabezas disponibles. Al finalizar el estímulo tetánico la $[Ca^{2+}]$ disminuye por debajo del umbral produciéndose el estado relajado post-tetánico (e), desactivándose los filamentos delgados por lo cual no se produce fuerza. El estado relajado post-tetánico (e) inmediato a la disminución de la $[Ca^{2+}]$ por debajo del umbral solo se diferencia del estado relajado en reposo (a) por la presencia de fosforilación remanente en Ser45, “memorizada” del tétano previo en (c). Como la fosforilación en Ser45 “memoriza” el último número de cabezas desprendidas disponible para producir fuerza en (c), un nuevo aumento breve de $[Ca^{2+}]$ por encima del umbral hace que ese último número de cabezas desprendidas produzca una fuerza semejante a la producida al final del tétano como se muestra en el inserto a la derecha de (f). Como la FLCM siempre está activa desfosforilando las Ser45 fosforiladas, una vez que la $[Ca^{2+}]$ disminuye por debajo del umbral luego del final de la estimulación tetánica en (c), el número de cabezas fosforiladas en Ser45 empieza inmediatamente a disminuir progresivamente, de manera tal que la magnitud de la fuerza de una sacudida post-tetánica depende del tiempo transcurrido desde la finalización del estímulo tetánico, disminuyendo progresivamente en función del tiempo. La memorización de cabezas desprendidas produce la potenciación post-tetánica, mostrada en el inserto del lado derecho de (f), explicando su origen en términos moleculares. La FLCM, que está siempre activa, desfosforila las Ser45 fosforiladas de las cabezas en el estado relajado post-tetánico (e), reformando progresivamente (~600s, Fig. 21) el arreglo en hélice de las cabezas de miosina (que reenlazaron ATP al inicio de la relajación produciéndose el cambio de estructura de las cabezas del estado abierto a cerrado) alrededor del esqueleto del filamento grueso por la reformación progresiva de las interacciones intra- e intermoleculares de los MCI de miosina (Fig. 24, tabla inferior), retornando progresivamente al estado relajado en reposo original (a), “borrando” la “memorización” de cabezas previamente listas para producir fuerza. Basado en Brito et al. 2011 y Alamo y col. 2017a

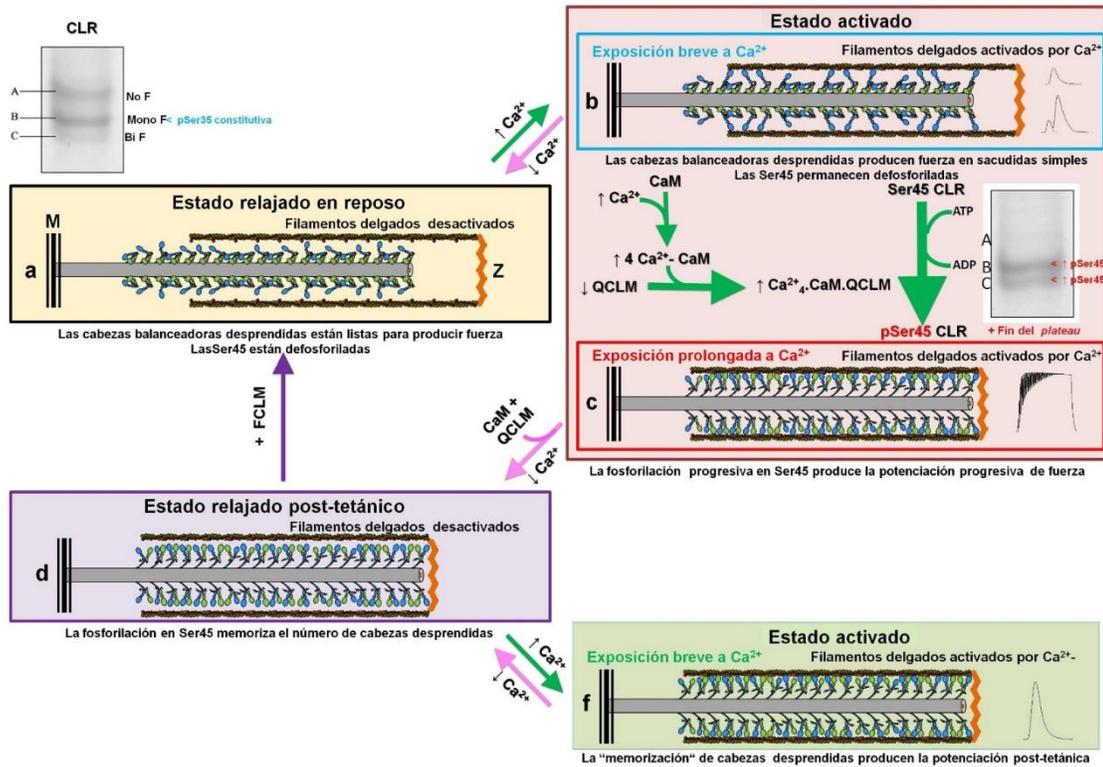


Figura 27. Mecanismo de contracción del sarcómero de músculo estriado de tarántula similar al mostrado en la Fig. 26 pero mostrando en (c) el estado final del *plateau* de un tétano fusionado en el cual se han reclutado todas las cabezas disponibles para producir fuerza, mostrándose el gel (recuadro derecho) obtenido al final del *plateau* del tétano fusionado Ver leyenda de la Fig. 26. Basado en Brito et al. 2011 y Alamo y col. 2017a

Conclusiones

- 1.- Se estandarizó una preparación que permite registrar la fuerza mecánica de la contracción de músculos estriados de tarántula así como determinar, durante tétanos fusionados, el nivel de fosforilación de las CLR de miosina.
- 2.- Se encontró que el músculo estriado *femoris cbensis* G de las extremidades del artrópodo quelicerado tarántula presenta el comportamiento típico de fibras rápidas y lentas reportado en algunos músculos estriados de vertebrado anfibios y mamíferos.

3.- Usando el paradigma “sacudida pre-tetánica – tétano - sacudida post-tetánica” se demostró en el músculo *femoris cbensis* la presencia del fenómeno de potenciación post-tetánica, exhibiendo características similares al reportado para músculo estriado de vertebrado y de otro invertebrado quelicerado como el escorpión.

4.- Se encontró que el nivel de fosforilación de las CLR de miosina, en comparación con el encontrado en músculo relajado, se modifica muy poco al principio estimado del plateau tetánico: la mono- y bi-fosforilación en Ser45 aumenta escasamente (+5 y +3% respectivamente). En contraste, al final del *plateau* ocurre un aumento substancial de la mono- y bi-fosforilación en Ser45 (+23 y +20% respectivamente) concomitante con la desaparición total (-39%) de las CLR no fosforiladas.

5.- La potenciación post-tetánica y el incremento de la mono- y bi-fosforilación; escaso al principio estimado del *plateau* tetánico pero substancial a su final, con la concomitante desaparición de las CLR no fosforiladas, apoyan fuertemente el mecanismo AFC propuesto para tarántula. Estudios futuros permitirán dilucidar si este aumento ocurre progresivamente hasta el final del tétano, o si se incrementa exponencialmente en el tiempo transcurrido desde el inicio del tétano hasta el inicio del *plateau* como lo predice dicho mecanismo.

Recomendaciones

- Ensayos con compuestos bloqueantes del sistema nervioso de la tarántula (e.g. curare)
- Utilización del pegamento celular MyoTak™ (IonOptix, Irlanda) o similares para tratar de fijar fibras aisladas de musculo estriado de tarántula sin necesidad de extensiones de tejido conectivo endógeno.

- Estudio de la fuerza mecánica y el patrón de fosforilación desde la relajación hasta la total activación tanto en condiciones normales como bajo el efecto de potenciadores de la contracción muscular.

Referencias

- Alamo, L., Koubassova, N., Pinto, A., Gillilan, R., Tsaturyan, A., & Padrón, R. (2017a). Lessons from a tarantula: new insights into muscle thick filament and myosin interacting-heads motifs structure and function. *Biophys Rev*, 9:461-480.
- Alamo, L., Li, X., Espinoza-Fonseca, L., Pinto, A., Thomas, D., Lehman, W., & Padrón, R. (2015). Tarantula myosin free head regulatory light chain phosphorylation stiffens N-terminal extension, releasing it and blocking its docking back. *Mol. BioSyst.*, 11:2180.
- Alamo, L., Padrón, R., Craig, R., & Caputo, C. (1987). Método para el congelamiento rápido con nitrógeno o helio líquido de músculos en contracción tetánica. *Acta Cient. Ven.*, 38(4): 513-514.
- Alamo, L., Pinto, A., Sulbarán, G., Mavárez, J., & Padrón, R. (2017b). Lessons from a tarantula: new insights into myosin interacting-heads motif evolution and its implications on disease. *Biophys Rev s.p.*
- Alamo, L., Qi, D., Wriggers, W., Pinto, A., Zhu, J., Bilbao, A., . . . Padrón, R. (2016). Conserved Intramolecular Interactions Maintain Myosin Interacting-Heads Motifs Explaining Tarantula Muscle Super-Relaxed State Structural Basis. *J. Mol. Biol.*, 428:1142-1164.
- Alamo, L., Ware, J., Pinto, A., Gillilan, R., Seidman, J., Seidman, C., & Padrón, R. (2016). Effects of myosin variants on interacting-heads motif explain distinct hypertrophic and dilated cardiomyopathy phenotypes. *eLIFE*, 1:31.
- Alamo, L., Wriggers, W., Pinto, A., Bártoli, F., Salazar, L., Zhao, F., . . . Padrón, R. (2008). Three-Dimensional Reconstruction of Tarantula Myosin Filaments Suggests How Phosphorylation May Regulate Myosin Activity. *J. Mol. Biol.*, 384: 780-797.
- Andersson, K. (s.f.). Effects of Calcium and Calcium Antagonists on the Excitation-Contraction Coupling in Striated and Smooth Muscle. *Department of Clinical Pharmacology, Institute of Pharmacology, University of Aarhus. Denmark.*, 5-14.
- Ashton, F., Somlyo, A., & Somlyo, A. (1975). The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereo electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 98: 17-29.
- Badre, N., Martin, M., & Cooper, R. (2005). The physiological and behavioral effects of carbon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140:363-376.

- Banga, I., & Szent-Györgyi, A. (1942). Preparation and properties of myosin A and B. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.*, I: 5-15.
- Barany, K., Barany, M., Gillis, J., & Kushmerick, M. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of the 18,000-dalton light chain of myosin during the contraction - relaxation cycle of frog muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 3617-3623.
- Barth, F. (1985). *Neurobiology of Arachnids*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Bernard, C. (1875). *Lecons sur les anesthésiques et sur l'asphyxie*. Paris: Librairie J.B. Baillière et Fils.
- Bers, M. (1991). Ca regulation in cardiac muscle. *Med., Science, Sports Exercise.*, 23:1157–1162.
- Bottinelli, R., & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 73: 195-262.
- Brito, R., Alamo, L., Lundberg, U., Guerrero, J., Pinto, A., Sulbaran, G., . . . Padron, R. (2011). A Molecular Model of Phosphorylation-Based Activation and Potentiation of Tarantula Muscle Thick Filaments. *J. Mol. Biol.*, 414, 44-61.
- Calderon, C., Bolaños, P., & C., C. (2014). The excitation–contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys Rev*, 6:133-160. doi:10.1007/s12551-013-0135-x.
- Calderón, J., Bolaños, P., Torres, S., Rodríguez-Arroyo, G., & Caputo, C. (2009). Different fibre populations distinguished by their calcium transient characteristics in enzymatically dissociated murine flexor digitorum brevis and soleus muscles. *J Muscle Res Cell Motil*, 30: 125-137.
- Caputo, C. (2011). *Compendio Histórico de Fisiología Muscular*. Caracas: Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
- Caputo, C., & Dipolo, R. (1978). Contractile activation phenomena in voltage-clamped barnacle muscle fiber. *J. Gen. Physiol*, 71:467-488.
- Caputo, C., DiPolo, R., & Padrón, R. (1974). Corrientes de entrada de calcio y activación de la contracción en fibras musculares de *Balanus nubilis* bajo condiciones de potencial controlado. *Acta Cient. Venez.*, 25(1):3.
- Caputo, C., Edman, K., Lou, F., & Y-B., S. (1994). Variation in myoplasmic Ca²⁺ concentration during contraction and relaxation studied by the indicator fluo-3 in frog muscle fibres. *Journal of Physiology*, MS2431:137-148.
- Cheng, A., & Westerblad, H. (2017). Mechanical isolation, and measurement of force and myoplasmic free [Ca²⁺] in fully intact single skeletal muscle fibers. *Nature Protocols*, 12:9:1763-1776.
- Cooke, R. (2011). The role of the myosin ATPase activity in adaptive thermogenesis by skeletal muscle. *Biophys. Rev.*, 3:33-45.
- Cooper, S., & Eccles, J. (1930). The isometric responses of mammalian muscles. ...*from the physiological laboratory, Oxford*.
- Craig, R., & Padrón, R. (1982). Structure of tarantula muscle thick filaments. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 3: 487.

- Craig, R., & Padrón, R. (2004). Molecular Structure of the Sarcomere. En A. Engel, & C. Franzini-Armstrong, *Myology*. McGraw-Hill.
- Craig, R., Padrón, R., & Kendrick-Jones, J. (1987). Structural Changes Accompanying Phosphorylation of Tarantula Muscle Myosin Filaments. *The Journal of Cell Biology*, 105: 1319-1327.
- Crowther, R., Padrón, R., & Craig, R. (1985). Arrangement of the Heads of Myosin in Relaxed Thick Filaments from Tarantula Muscle. *J. Mol. Biol*, 184: 429-439.
- Dillon, L. (1952). The myology of the araneid leg. *Department of Biology, Agricultural and Mechanical College of Texas.*, 467-480.
- El Haj, A., & Houlihan, D. (1987). In vitro and in vivo protein synthesis rates in a crustacean muscle during the moult cycle. *J. Exp. Biol.*, 127:413-426.
- Ellis, C. (1944). The mechanism of extension in the legs of spiders. *Biol. Bull.*, 86: 41-50.
- Endo, M., Tanaka, M., & Ogawa, Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*, Vol. 228.
- Engelhardt, V., & Lyubimova, M. (1939). Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature*, 144: 668-669.
- Espinoza-Fonseca, L., Alamo, L., Pinto, A., Thomas, D., & Padrón, R. (2015). Sequential myosin phosphorylation activates tarantula thick filament via a disorder-order transition. *Mol. BioSyst.*, 11:2167.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 245:C1-C14.
- Fill, M., & Copello, J. (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol Rev*, 82: 893-922.
- Foelix, R. (2010). *Biology of spiders*. New York: Oxford University Press.
- Franzini-Armstrong, C. (1973). Studies of the triad. IV. Structure of the junction in frog slow fibers. *J. Cell Biol.*, 56:120-128.
- Gazith, J., Himmelfarb, S., & Harrington, W. (1970). Studies on the Subunit Structure of Myosin. *The Journal of Biological Chemistry*, 245:15-22.
- Geeves, M., & Federov, R. a. (2005). Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 62:1462-1477.
- Gilai, A., & Parnas, I. (1972). Electromechanical coupling in tubular muscle fibers. I. The organization of tubular muscle fibers in the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *J. Cell Biol.*, 52:626-638.
- Gilly, W., & Scheuer, T. (1984). Contractile activation in scorpion striated muscle fibers. Dependence on voltage and external calcium. *J. Gen. Physiol*, 84:321-345.
- Gruber, C. (1923). Studies in fatigue: The staircase phenomenon in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol*, 63 (2) 338-349.
- Guerrero, J., & Padrón, R. (1992). The substructure of the backbone of the thick filaments from tarantula muscle. *Acta Microscopica*, 1:63-83.

- Gyorke, S., & Palade, P. (1993). Role of local calcium domains in activation of calcium induced calcium release in crayfish muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 264:C1505–C1512.
- Gyorke, S., & Palade, P. (1994). Calcium dependent negative control mechanism for calcium induced calcium release in crayfish. *J. Physiol.*, 476:315-322.
- Hasselbach, W. (1964). Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Prog Biophys Mol Biol*, 14:167-222.
- Hatch, V., Zhi, G., Smith, L., Stull, J., Craig, R., & Lehman, W. (2001). Myosin light chain kinase binding to a unique site on F-actin revealed by three-dimensional image reconstruction. *J Cell Biol*, 154:611-617.
- Hidalgo, C., Craig, R., Ikebe, M., & Padrón, R. (2001). Mechanism of phosphorylation of the regulatory light chain of myosin from tarantula striated muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 22: 51-59.
- Hill, A. (1938). The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. ..., ...
- Himmel, D., Mui, S., O'Neill-Hennessey, E., Szent-Gyorgyi, A., & Cohen, C. (2009). The on-off switch in regulated myosins: different triggers but related mechanisms. *J. Mol. Biol.*, 394:496-505.
- Holmes, K. (1998). A Molecular Model for Muscle Contraction. *Acta Cryst.* , A54, 789-197.
- Hoyle, G. (1978). Distributions of nerve and muscle fibre types in locust jumping muscle. *J. Exp. Biol.*, 73:205-233.
- Huxley, A., & Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 22;173(4412):971-3.
- Huxley, H. (1957). The double array of filaments in cross striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, 3:631-648.
- Huxley, H. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.*, 7:281-308.
- Huxley, H., & Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 23;172(4412):973-6.
- Katoh, T., & Lowey, S. (1989). Mapping myosin light chains by immunoelectron microscopy. Use of anti-fluorescyl antibodies as structural probes. *The Journal of Cell Biology*, 109:1549.
- Kendrick-Jones, J., Lehman, W., & Szent-Gyorgyi, A. (1970). Regulation in Molluscan Muscles. *J. Mol. Biol.*, 54: 313-326.
- Kominz, D., Carroll, W., Smith, E., & Mitchell, E. (1959). A subunit of Myosin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 79:191-199.
- Krarup, C. (1981). Enhancement and diminution of mechanical tension evoked by staircase and by tetanus in rat muscle. *J Physiol*, 311:355-372.
- Kropf, C. (2013). *Spider Ecophysiology*. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Kühne, W. (1864). *Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität*. Leipzig: W. Engelmann.
- Kvamme, E. (2018). *Glutamine and Glutamate Mammals*. CRC Press.
- Lee, K., Sulbarán, G., Yang, S., Mun, J., Alamo, L., Pinto, A., . . . Craig, R. (2018). The Interacting-Heads Motif has been conserved as a mechanism of myosin II inhibition since before the origin of animals. *Proceeding of the National Academy of Sciences (U.S.A)*, en prensa.
- Lehman, W., & Szent-Gyorgyi, A. (1975). Regulation of Muscular Contraction. Distribution of Actin Control and Myosin Control in the Animal Kingdom. *The Journal of General Physiology*, 66: 1-30.
- Levine, R., Kensler, R., Reedy, M., Hofmann, W., & King, H. (1983). Structure and Paramyosin Content of Tarantula Thick Filaments. *The Journal of Cell Biology*, 97: 186-195.
- Lewbart, G. (2012). *Invertebrate Medicine*. John Wiley & Sons, Inc.: West Sussex.
- Linarez, N. (2002). *Estudio de la estructura del aparato contractil y de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina del músculo estriado de escorpión*. Caracas, Venezuela.: Tesis de M- Sc. Centro de estudios Avanzados (CEA), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).
- Liu, J., Wendt, T., Taylor, D., & Taylor, K. (2003). Refined Model of the 10 S Conformation of Smooth Muscle Myosin by Cryo-electron Microscopy 3D Image Reconstruction. *J. Mol. Biol.*, 329:963-972.
- Lohmann, K. (1934). Über die enzymatische ausspaltung der kreatinephosphorsaure; zugleich ein beitrage zum chemismus der muskelkontraktion. *Biochem. Z.*, 271: 264-277.
- Luther, P., Winkler, H., Taylor, K., Zoghbi, M., Craig, R., Padron, R., . . . Liu, J. (2011). Direct visualization of myosin-binding protein C bridging myosin and actin filaments in intact muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 108:11423-11428.
- Lynn, R. a. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate. *Biochemistry.*, 10:4617-4624.
- Maier, L., Root, T., & Seyfarth, E.-A. (1987). Heterogeneity of spider leg muscle: histochemistry and electrophysiology of identified fibers in the claw levator. *J Comp Physiol B*, 157:285-294.
- Malmivuo, J., & Plonsey, R. (1995). *Bioelectromagnetism - Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. New York: Oxford University Press.
- Moore, R., & Stull, J. (1984). Myosin light chain phosphorylation in fast and slw skeletal muscles in situ. *Am J Physiol Cell Physiol*, 247(5);C462-C471.
- Mounier, Y., & Goblet, C. (1987). Role of the different calcium sources in the excitation-contraction coupling in crab muscle fibres. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65:667-671.
- Mueller, H., & Perry, S. (1962). The degradation of heavy meromyosin by tripsin. *Biochem. J.*, 85: 431-439.

- Mykles, D., & Skinner, D. (1982). Molt cycle-associated changes in calcium-dependent proteinase activity that degrades actin and myosin in crustacean muscle. *Dev. Biol.*, 92:386-397.
- Naber, N., Cooke, R., & Pate, E. (2011). Slow Myosin ATP Turnover in the Super-Relaxed State in Tarantula Muscle. *J. Mol. Biol.*
- Padrón, R. (1974). Propiedades eléctricas pasivas de fibras musculares de *Balanus*. *Acta Cient. Venez.*, 25(1):3.
- Padrón, R., Alamo, L., Craig, R., & Caputo, C. (1988). A method for quick-freezing live muscles at known instants during contraction with simultaneous recording of mechanical tension. *J. Microsc.*, 151:81-102.
- Pante, N., Sosa, H., & Padrón, R. (1988). Estudio por difracción de rayos-x de los cambios estructurales que acompañan la fosforilación de los filamentos gruesos de músculo de tarántula. *Acta Científica Venezolana*, 39:230-236.
- Parry, D., & Brown, R. (1959). The hydraulic mechanism of the spider leg. *J. Exp. Biol.*, 36:423-433.
- Parry, D., & Squire, J. (1973). Structural role of Tropomyosin in Muscle Regulation: Analysis of the X-ray Difraccion Patterns from Relaxed and Contracting Muscles. *J. Mol. Biol.*, 75:33-55.
- Perry, S. (1951). The adenosinetriphosphatase activity of myofibrils isolated from skeletal muscle. *Biochem. J.*, 48: 257-265.
- Ramsey, R., & Street, S. (1940). The isometric length-tension diagram of isolated skeletal muscle fibers of the frog., ...
- Ranke, J. (1865). *Tetanus: Eine Physiologische Studie*. Leipzig.: Wilhelm Engelmann.
- Rayment, I., & Holden, H. (1993). Myosin subfragment-1: structure and function of a molecular motor. *Current opinion in structural biology.*, 3:944-952.
- Ruhland, M., & Rathmayer, W. (1978). Die Beinmuskulatur und ihre Innervation bei der Vogelspinne *Dugesia hentzi* (Ch.) (Araneae, Aviculariidae). *Zoomorphologie*, 89: 33-46.
- Ryder, J., Lau, K., Kamm, K., & Stull, J. (2007). Enhanced Skeletal Muscle Contraction with Myosin Light Chain Phosphorylation by a Calmodulin-sensing Kinase. *The journal of Biological Chemistry*, 28:20447-20454.
- Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *Department of Biology, Washington Square College of Arts and Science. New York University.*
- Schartau, W., & Leidescher, T. (1983). Composition of the hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*. *J Comp Physiol*, 152: 73-77.
- Schneider, M. (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol*, 56:463-484.
- Sellers, J. (1981). Phosphorylation-dependent regulation of *Limulus* myosin. *J. Biol. Chem.*, 256:9274-9278.
- Sherman, R., & Luff, A. (1971). Structural features of the tarsal claw muscles of spider *Eurypelma marxi* Simon. *Can. J. Zool.*, 49: 1549-1556.

- Skinner, D. (1965). Amino acid incorporation into protein during the molt cycle of the land crab *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Zool.*, 160:225-234.
- Skinner, D. (1966). Breakdown and reformation of somatic muscle during the molt cycle of the land crab *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Zool.*, 163:115-124.
- Smith, I., Gittings, W., Bloemberg, D., Huang, J., Quadrialtero, J., Tupling, A., & R., V. (2013). Potentiation in mouse lumbrical muscle without myosin light chain phosphorylation: Is resting calcium responsible? *J Gen Physiol* , 141 (3): 297-308.
- Stewart, M., Franks-Skiba, K., Chen, S., & Cooke, R. (2010). Myosin ATP turnover rate is a mechanism involved in thermogenesis in resting skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107:430-435.
- Straub, F. (1942). Actin. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.*, II:3-15.
- Straub, F. (1943). Actin, II. *stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.*, III:23-37.
- Sulbarán, G., Biasutto, A., Alamo, L., Riggs, C., Pinto, A., Méndez, F., . . . Padrón, R. (2013). Different Head Environments in Tarantula Thick Filaments Supports a Cooperative Activation Process. *Biophysical Journal*, 105:2114-2122.
- Szent-Györgyi, A. (1943). The crystallization of myosin and some of its properties and reactions. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.*, III:76-85.
- Szent-gyorgyi, A., & E., S. (1973). The Light Chains of Scallop Myosin as Regulatory Subunits. *J. Mol. Biol.*, 74: 179-203.
- Takekura, H., & Franzini-Armstrong, C. (2002). The Structure of Calcium Release Units in Arthropod Body Muscles Indicates an Indirect Mechanism for Excitation-Contraction Coupling. *Biophysical Journal*, 83:2742-2753.
- Takeuchi, A. (1987). The Transmitter Role of Glutamate in Nervous Systems. *Japanese Journal of Physiology*, 37:559-572.
- Tsao, T. (1953). Fragmentation of the myosin molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, 11:368-382.
- Ueda, I. (2001). Molecular mechanisms of anesthesia. *Keio J Med*, 50(1):20-25.
- Vandenboom, R. (2017). Modulation of Skeletal Muscle Contraction by Myosin Phosphorylation. *Comprehensive physiology*, 7:171-212.
- Vibert, P., & Craig, R. (1983). Electron Microscopy and Image Analysis of Myosin Filaments From Scallop Striated Muscle. *J. Mol. Biol.*, 165: 303-320.
- Vileno, B., Chamoun, J., Liang, H., Brewer, P., Haldeman, B., & Facemyer, K. (2011). Broad disorder and the allosteric mechanism of myosin II regulation by phosphorylation. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 108: 8218-8223.
- Weeds, A. G. (1969). Light Chains of Myosin. *Nature*, 223:1362-1364.
- Weeds, A., & Lowey, S. (1971). Substructure of the myosin molecule. II The light chains of Myosin. *J. Mol. Biol.*, 61:701-725.
- Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K., & Taylor, K. (2001). Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *PNAS*, 98:4361-4366.

- Wilson, R. (1970). Some comments on the hydrostatic system of spiders (Chelicerata, Aranae). *Zoomorph*, 74: 221.
- Woodhead, J., Zhao, F., Craig, R., Egelman, E., Alamo, L., & Padrón, R. (2005). Atomic model of myosin filament in the relaxed state. *Nature*, 436.
- Yamaoka, L., & Skinner, D. (1975). Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the chelae muscle of the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52b:499-502.
- Zacharova, D., & Zachar, J. (1967). The effect of external calcium ions on the excitation-contraction coupling in single muscle fibres of the crayfish. *Physiol. Bohemoslov.*, 16:191–207.
- Zhi, G., Ryder, J., Huang, J., Ding, P., Chen, Y., Zhao, Y., . . . Stull, J. (2005). Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. *PNAS*, 48: 17519-17524.